

**Aus der Klinik für Gastroenterologie und  
Endokrinologie**

**Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress**

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH,  
Standort Marburg**

**Einfluss des PAR-2 auf die epitheliale Permeabilität  
und Ionensekretion im Gastrointestinaltrakt**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität  
Marburg**

**vorgelegt von**

**Süha Dasdelen aus Mosbach**

**Marburg, 2012**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
13.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Rothmund

**Referent:** PD Dr. Stephan Böhm

**Korreferent:** Prof. Dr. P. Alter

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

### 1.1. Proteinase Aktivierte Rezeptoren

#### 1.1.1. Geschichte

#### 1.1.2. Pharmakologie

##### 1.1.2.1. Rezeptortypen und Struktur

##### 1.1.2.2. Aktivierung

##### 1.1.2.3. Signaltransduktion

##### 1.1.2.4. Signalterminierung und Degradation des Rezeptors

#### 1.1.3. Physiologie und Funktionen der PARs

##### 1.1.3.1. PAR-1-Funktionen

###### 1.1.3.1.1. PAR-1 und das kardiovaskuläre System

###### 1.1.3.1.2. PAR-1 und Thrombozyten

###### 1.1.3.1.3. PAR-1 und Immunzellen

###### 1.1.3.1.4. PAR-1 und das respiratorische System

###### 1.1.3.1.5. PAR-1 und der Gastrointestinaltrakt

###### 1.1.3.1.6. PAR-1 und der Urogenitaltrakt

##### 1.1.3.2. PAR-2-Funktionen

###### 1.1.3.2.1. PAR-2 und das kardiovaskuläre System

###### 1.1.3.2.2. PAR-2 und das Immunsystem

###### 1.1.3.2.3. PAR-2 und Arthritis

###### 1.1.3.2.4. PAR-2 und das respiratorische System

###### 1.1.3.2.5. PAR-2 und der Gastrointestinaltrakt

##### 1.1.3.3. PAR-3 und PAR-4 Funktionen

### 1.2. Regulation des epithelialen Ionentransportes und der epithelialen Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt

### 1.3. Hypothese zur der Funktion des PAR-2 bezüglich der Ionensekretion und epithelialen Permeabilität

im Gastrointestinaltrakt

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Grundlagen**

#### **2.2.1. Geräte**

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

2.2.4 Chemikalien/Reagenzien

2.2.4 Zellen

2.2.5 Lösungen und Medien

### **2.3. Methoden**

2.3.1 Zellkultur

2.3.2 Subkultivierung und Aussaat in die  
Kulturplatteneinsätze

2.3.4 Kryokonservierung und Auftauen

2.3.5 Ussing-Kammer

2.3.6 Calcium-Photometrie

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Charakterisierung der Zellen**

3.1.1 T 84-Zelllinie

3.1.2 HT-29 Cl.16E

3.1.2.1 Calcium-Photometrie

3.1.3 Theoretische Überlegungen bei der Auswahl  
der Zelllinien

### **3.2. Entwicklung des transepithelialen Widerstandes über die Zeit**

3.2.1 Anstieg des TER in 10 Tagen (HT-29 Cl.16E)

3.2.2 Anstieg des TER in 10 Tagen (T84)

3.2.3. Dose Response PGE<sub>2</sub> T84

3.2.3. Dose Response PGE<sub>2</sub> HT-29 Cl.16E

### **3.3. Messgrößen und Ausgangswerte**

### **3.4. Einfluss von Trypsin und des PAR-2 aktivierenden Peptid auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in der Zelllinie HT-29 Cl.16E**

### **3.5. Einfluss von Trypsin und des PAR-2 Agonisten aktivierendes Peptid auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in der Zelllinie T84**

### **3.6. Basolaterale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit Trypsin und PAR-2 AP, Zeitverlauf des TER-Anstiegs**

- 3.7. Apikale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit Trypsin und PAR-2 AP, Zeitverlauf des TER-Anstiegs
- 3.8. Basolaterale Stimulation von T84 Zellen mit Trypsin und Zeitverlauf von TER und Isc
- 3.9. Basolaterale Stimulation von T84 Zellen mit PAR-2 AP und Zeitverlauf von TER und Isc
- 3.10. Veränderungen des transepithelialen Widerstandes unter Carbachol
  - 3.10.1. Basolaterale und apikale Stimulation mit Carbachol bei HT-29 Cl.16E Zellen
  - 3.10.2. Basolaterale und apikale Stimulation mit Carbachol, T 84

#### **4. Diskussion**

- 4.1 Nachweis der Chloridsekretion durch PGE2 in HT-29 Cl.16E und T84-Zellen
- 4.2 Einfluss von Trypsin und des PAR-2 aktivierenden Peptids auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in den Zelllinien HT-29 Cl.16E und T84
- 4.3 Zeitverlauf des TER-Anstiegs nach apikaler und basolateraler Stimulation unter Trypsin und PAR-2 aktivierenden Peptid in den Zelllinien HT-29 Cl.16E und T84
- 4.4 Veränderungen des Kurzschlussstromes
  - 4.4.1 HT-29 Cl.16E
  - 4.4.2 T84
- 4.5 Veränderungen des transepithelialen Widerstandes und des Kurzschlussstromes unter Carbachol
- 4.6 Regulation der epithelialen Ionensekretion und des transepithelialen Widerstandes in vitro und in vivo durch PAR-2
- 4.7 Zusammenfassung

#### **5. Anhang**

- 5.1 Literaturverzeichnis
- 5.2 Lebenslauf

## 5.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

## 5.4 Danksagungen

# 1. Einleitung

Proteolytische Enzyme nehmen schätzungsweise 2% der Gene im menschlichen Genom ein (Southan C. et al, 2001).

So ist es auch nicht überraschend, dass diese Gruppe von Enzymen vielfältige biologische Funktionen übernimmt.

Proteolytische Enzyme im Gastrointestinaltrakt helfen bei der Verdauung der aufgenommenen Nahrungsbestandteile. Andere haben wichtige Schlüssel-Funktionen in der Hämostase und der Aktivierung der Komplementkaskade. Lysosomale Enzyme sind bei vielen katabolen Stoffwechselprozessen beteiligt.

Seit einiger Zeit ist eine weitere bedeutende Eigenschaft für einen Teil dieser Enzyme bekannt geworden: durch Proteolyse ist es bestimmten Proteasen möglich einen besonderen Subtyp G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) zu aktivieren.

Diese Proteinase aktivierten Rezeptoren (=PAR) sind nunmehr seit ungefähr 20 Jahren bekannt und in den letzten 15 Jahren verstärkt Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen zum Expressionsmuster im menschlichen Körper, ihren pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften, aber vor allem auch zur Aufdeckung ihrer komplexen biologischen Interaktionen und Funktionen im menschlichen Organismus.

Durch zahlreiche Untersuchungen sind der Aktivierungsprozess mit den beteiligten Enzymen und die Rezeptorstruktur mit der intrazellulären Signaltransduktion relativ gut untersucht. Die daraus resultierenden Funktionen sind jedoch nur bruchstückhaft erforscht (Macfarlane et al, 2001).

## 1.1. Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR)

### 1.1.2. Geschichte

Die Rolle von Thrombin als einem Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Erste Untersuchungen, die zeigten, dass diese Serin-Protease unabhängig von der Gerinnungskaskade imstande ist die Thrombozytenaggregation in Gang zu setzen und damit den Hinweis auf eine direkte Interaktion des Enzyms mit den Effektorzellen ergaben, erfolgten im Jahr 1967 (Davey MG et al, 1967).

In der Folgezeit zeigten zahlreiche Studien, dass Thrombin einen direkten Einfluss auf eine ganze Reihe von Zelltypen ausübt (u.a. Monozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Lymphozyten, etc. (Chen LB et al, 1975; Chen LB et al, 1976; Bar-Shavit R et al, 1983; Bizios R et al, 1986; Hattori R et al, 1989)). Auf welchem Weg dies geschieht und falls es sich um eine rezeptorvermittelte Aktivierung handelt, um welchen Rezeptor es sich handelt, blieb jedoch bis 1991 weitestgehend unklar.

Zu diesem Zeitpunkt gelang es zwei Arbeitsgruppen den ersten der bisher bekannten vier PAR –Typen zu klonieren (Vu et al, 1991; Rasmussen UB et al 1991).

Coughlins Arbeitsgruppe (Vu et al, 1991) extrahierte hierzu mRNA aus Zellen, welche eine besonders hohe Ansprechrate auf Thrombin haben, und injizierte diese anschließend in *Xenopus* Oozyten. Nach einigen Arbeitsschritten wurde schließlich ein Protein mit 425 Aminosäuren identifiziert. Die genauere Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass das Protein 7 hydrophobe Domänen besitzt und somit ein typischer Vertreter der Rezeptorsuperfamilie mit 7 transmembranären Einheiten ist (GPCR). In der Folgezeit wurden Struktur, Aktivierungsmechanismus, Signaltransduktion, Expressionsmuster und Funktion auf verschiedenen Zellen näher charakterisiert. Der Thrombin-Rezeptor wurde als erster Rezeptor dieser Familie in der Folge PAR-1 genannt.

## 1.1.2. Pharmakologie

### 1.1.2.1. Struktur der Proteinase-aktivierten Rezeptoren

Derzeit umfasst die PAR-Familie 4 Rezeptoren (PAR-1-4). Hierbei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 transmembranären Einheiten. Darüber hinaus besitzen PAR-Rezeptoren einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären Carboxy-Terminus. Der extrazelluläre Aminoterminus beinhaltet die eigentliche Bindungs- und Schnittstelle für die Proteinase.

Einige Zeit nach der Charakterisierung des PAR-1 als speziellem Thrombinrezeptor fanden sich Hinweise, dass man hier eine neue Rezeptorfamilie entdeckt hatte. So wurde der PAR-2 zufällig entdeckt, als Nystedt et al. 1994 das Genom einer Maus mit Primern der zweiten und sechsten transmembranären Domäne des Neurokinin 2 Rezeptors durchsuchten (Nystedt et al. 1994). Sie entdeckten ein Protein mit einer Peptidlänge von 395 Aminosäuren, den typischen Charakteristika eines G-Protein gekoppelten Rezeptors und einer 30%-igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit dem humanen PAR-1. Der extrazelluläre Terminus mit einer Peptidlänge von 46 Aminosäuren (=AS) beinhaltet eine Schnittstelle für Trypsin (SKGR<sup>34</sup> ↓ S<sup>35</sup>LIGKV ↓ zeigt die Schnittstelle an) (Böhm SK et al, 1995). Er unterscheidet sich von PAR-1 u.a. durch das Fehlen einer Hirudin-binding-domain (siehe Abb.1).

Die Entdeckung des PAR-2 gab schließlich den Anstoß weitere Vertreter dieser Rezeptorfamilie zu identifizieren. Die Beobachtung, dass die Zugabe von Thrombin zu PAR-1-defizienten Thrombozyten von Ratten trotzdem eine Aggregation auslösen konnte, legte die Vermutung nahe, dass ein weiterer durch Proteolyse aktivierbarer Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert werden müsse. Dieser Rezeptor (PAR-3) wurde durch den Einsatz von Primern bestimmter Domänen des PAR-1 und PAR-2 in der RNA von Ratten-Thrombozyten entdeckt (369 Aminosäuren) (Ishihara H et al, 1997).

Der PAR-3 besitzt zu PAR-1 und PAR-2 eine Aminosäurehomologie von 28%.

Der extrazelluläre Aminoterminus mit einer Länge von 33 Aminosäuren enthält bei LPIK<sup>38</sup>↓T<sup>39</sup>FRGAP eine Schnittstelle für Thrombin.

Bei weiteren Nachforschungen gelang es im Jahr 1998 zwei Arbeitsgruppen den vierten Rezeptor aus dieser Gruppe zu klonen (Xu WF et al, 1998; Kahn ML et al, Aug 1998). Der PAR-4 hat eine Peptidlänge von 385 AS mit einer Schnittstelle am extrazellulären Aminoterminus, die von Thrombin und Trypsin erkannt wird. Trotz der ca. 33%-igen Übereinstimmung mit anderen humanen PARs zeigt dieser Subtyp deutliche Unterschiede im Carboxy- und Aminoterminus.

Abb. 1:

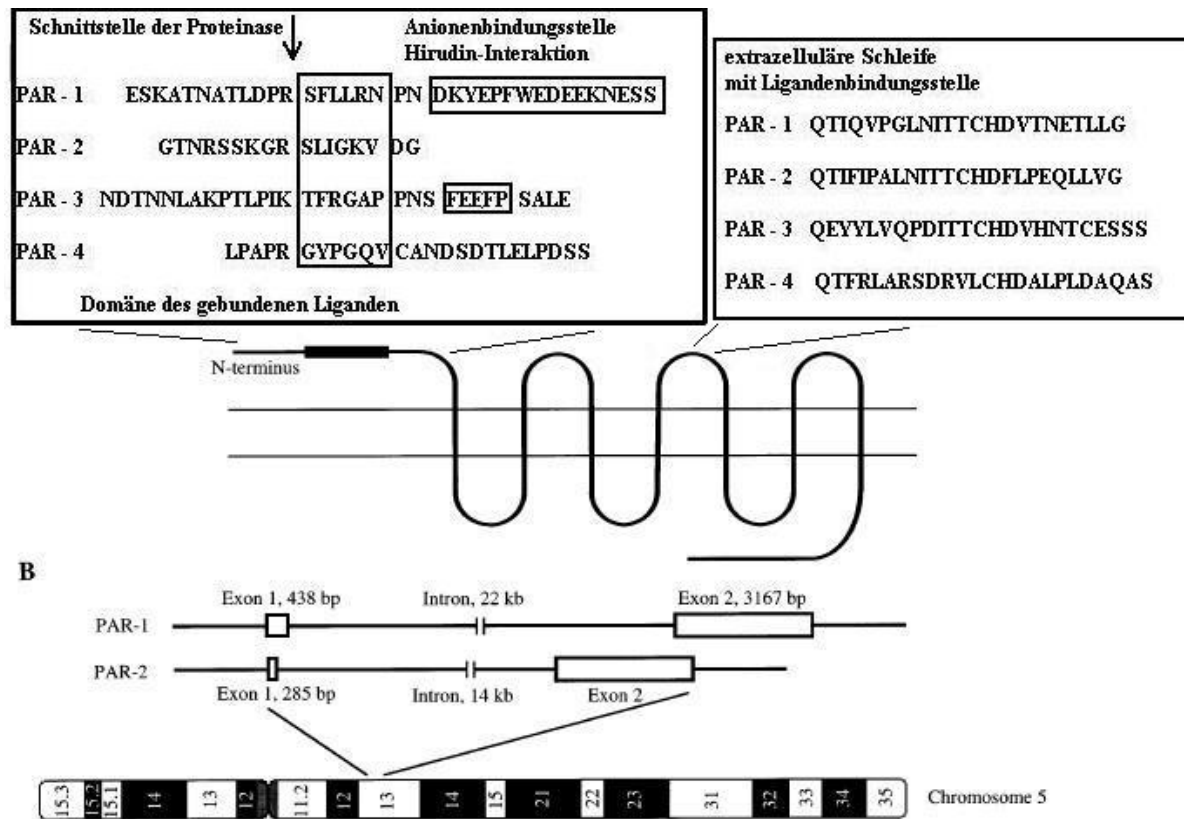


Abb.1: A: Protein Struktur von PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4. Aminosäuresequenz im NH<sub>2</sub>-Terminus und extrazelluläre Schleife, die für die Rezeptoraktivierung wichtig ist. Im Kasten 1 und 2 dargestellt sind die gebundenen Ligandendomänen für PAR-1-4 und die Anionenbindungsstelle für PAR-1 und PAR-3

B: Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation von PAR-1 und PAR-2. Beide Rezeptoren liegen innerhalb von 100 kb auf Chromosom 5q13 (Xu WF et al, 1998)

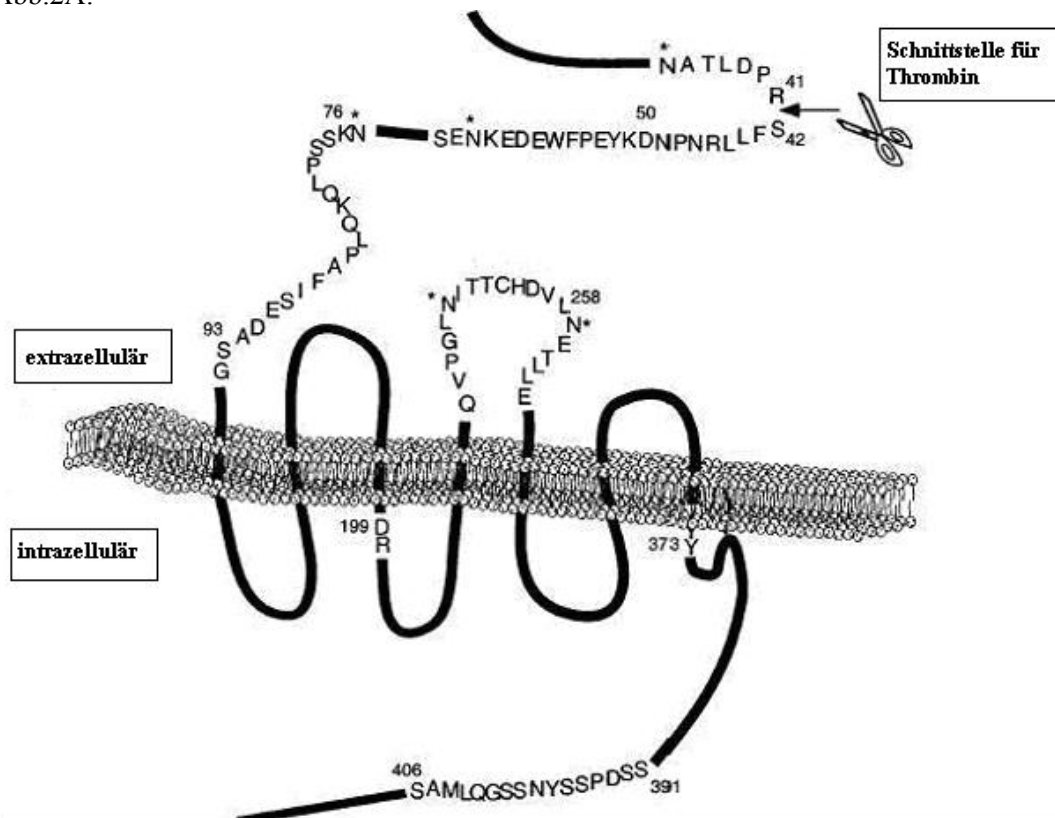
In der oben gezeigten Abbildung sieht man das Grundprinzip des Rezeptoraufbaus mit dem gebundenen Liganden im Bereich des extrazellulären Aminoterminus sowie die auf der 2. extrazellulären Schleife liegende Ligandenbindungsstelle. Die Aminosäuresequenz des Liganden und der korrespondierenden Bindungsstelle wird für alle 4 Rezeptortypen (PAR-1-4) dargestellt. Beim Menschen liegen die PAR-1-, PAR-2- und PAR-3-Gene nahe beieinander auf Chromosom 5q13, wohingegen PAR-4 auf 19p12 lokalisiert ist (Kahn ML et al, Aug 1998; Xu WF et al 1998). Alle vier Subtypen weisen eine identische Genstruktur aus zwei Exons auf, die durch ein einzelnes langes Intron unterbrochen werden (Cupit et al, 1999; Kahn ML et al, Sept. 1998). Dabei kodiert das erste Exon für die 5'-untranslatierte Region, das Startcodon und ein Signalpeptid, wohingegen das zweite Exon für das Rezeptorprotein und die 3'-untranslatierte Region kodiert (Kahn ML et al, Aug 1998).



### 1.1.2.2. Aktivierung

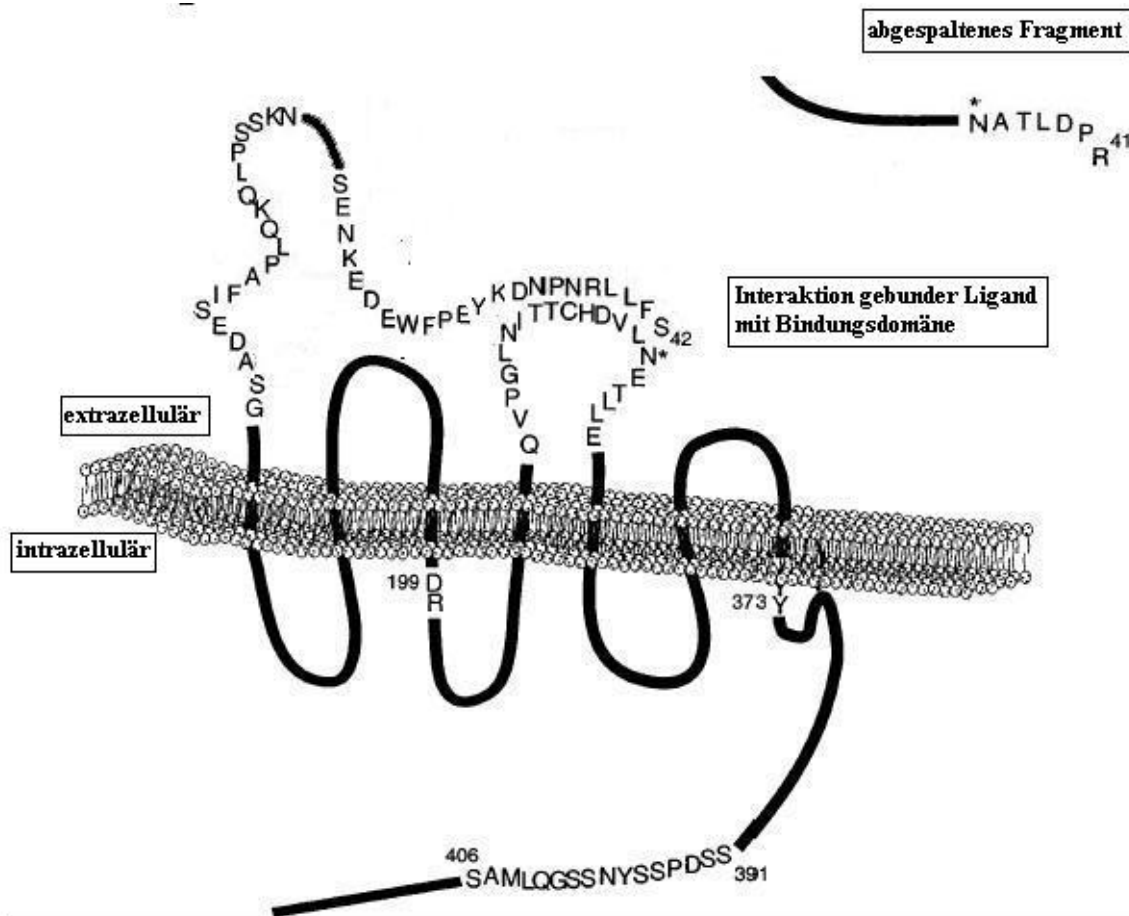
Das Prinzip der Rezeptoraktivierung ist bei allen durch Proteasen aktivierten Rezeptoren identisch: Die Protease spaltet den extrazellulären Aminoterminal des Rezeptors an einer spezifischen Stelle. Diese Spaltung führt zur Entstehung eines neuen Aminoterminal, der nun sozusagen als gebundener Ligand des Rezeptors diesen zu aktivieren vermag, indem der Neo-N-Terminus an eine spezifische Region im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife anlagert. Hieraus resultiert im Weiteren eine Konformationsänderung des Rezeptors, die die intrazelluläre Signaltransduktion initiiert. Für das freie aminoterminal Fragment, das durch die Proteolyse abgespalten wurde, ist keine Funktion bekannt. In der folgenden Abbildung ist die Aktivierung des Rezeptors schematisch dargestellt.

Abb.2A:



A = Aktivierungsschema am Beispiel des PAR-1:  
Dargestellt ist die Abfolge der Aminosäuresequenz im Bereich der Schnittstelle von Thrombin und die Bindungsregion im Bereich der 2. extrazellulären Schleife

Abb.2B:



**B: Aktivierungsschema am Beispiel des PAR-1: Anlagerung des gebundenen Liganden an die Bindungsdomäne der 2. extrazellulären Schleife mit nachfolgender Konformationsänderung des Rezeptors**

(Peter J.O. Brien, 2001)

Untersuchungen, die die Hypothese dieses Aktivierungsmechanismus unterstützen und belegen, wurden am zahlreichsten für den PAR-1 durchgeführt. Hierunter ist u.a. die Beobachtung, dass durch eine Mutation im Bereich der extrazellulären Schnittstelle eine Aktivierung und Signaltransduktion mittels Thrombin verhindert wird (Vu et al, 1991)

Ähnliche Ergebnisse konnten u.a. auch für den PAR-2 gezeigt werden. Auch in diesem Fall führte die Mutation des extrazellulären N-Terminus zur Inhibierung einer Aktivierung durch Trypsin. Synthetisch hergestellte Peptide, die mit der gebundenen Ligandendomäne korrespondieren (SLIGKV) sind in der Lage, ohne Anwesenheit von Trypsin den Rezeptor zu aktivieren. (Nystedt et al, 1995).

Allerdings sind die Peptide deutlich weniger potent als die jeweilige Protease, während Proteasen bereits bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M eine Rezeptorantwort auslösen, benötigt man von einem aktivierenden Peptid die 1000-fache Konzentration. Grund hierfür ist die Fähigkeit der Protease mehrere Rezeptoren zu aktivieren, indem die proteolytische Spaltung des extrazellulären Terminus an vielen verschiedenen Rezeptoren durchgeführt werden kann, bevor eine Inaktivierung stattfindet. Dagegen vermag ein Molekül aktivierendes Peptid jeweils auch nur einen Rezeptor nach Anlagerung an die Bindungsdomäne zu aktivieren. Darüber hinaus muss man vermuten, dass ein bestimmter Teil der aktivierenden Peptide durch Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft (sowohl membrangebunden als auch frei im Lumen befindlich) bereits vor einer Anlagerung an den Rezeptor inaktiviert wird. Ein weiterer Nachweis für die proteolytische Aktivierung des Rezeptors, bei der der N-Terminus geschnitten wird, beruht auf dem Einsatz eines Antikörpers, der ein aminoterminales Epitop erkennt. Der Antikörper weist somit den intakten, nicht aktivierten Rezeptor nach. Nach Applikation der Protease nahm die Bindungskapazität für die Antikörper deutlich ab (Böhm SK et al, 1996).

Ähnliche Ergebnisse im Hinblick auf die Aktivierung konnten auch für den PAR-4 gezeigt werden. Auch in diesem Fall ist das synthetisch hergestellte Peptid in der Lage den Rezeptor direkt zu aktivieren (Kahn ML et al, Sept. 1998).

Der PAR-3 nimmt in diesem Punkt eine Sonderstellung ein. Das korrespondierende Peptid vermag in diesem Falle nicht den Rezeptor zu aktivieren. Nur eine proteolytische Spaltung durch Thrombin setzt die Signaltransduktion in Gang. Der Grund hierfür ist nicht genau bekannt. Vermutet wird, dass möglicherweise eine allosterische Konformationsänderung des Rezeptors für die Aktivierung zwingend erforderlich ist, und diese durch die Bindung eines Peptides im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren nicht erreicht wird.

Insgesamt belegen diese und weitere Arbeiten diesen speziellen mittels partieller Proteolyse des Rezeptors ablaufenden Aktivierungsmechanismus.

Weitere Untersuchungen zeigten auch, dass die Signalinitiierung in der Gruppe der PARs u.a. auch von der Coexpression verschiedener PAR-Typen auf ein und derselben Zelloberfläche abhängig ist. So wurde z.B. beobachtet, dass synthetisch hergestellte Peptide, die in der Lage sind den PAR-1 zu aktivieren ebenfalls den PAR-2 aktivieren können (jedoch nicht umgekehrt). Um diesen Effekt genauer zu untersuchen wurden Experimente mit Zellen durchgeführt, die einen veränderten PAR-1-Typ mit gestörter, bzw. aufgehobener intrazellulärer Signaltransduktion exprimierten. Im ersten Versuchsansatz wurden Zellen untersucht, die nur die veränderte PAR-1 Mutante exprimierten. Eine Stimulation mit Thrombin zeigte in dieser Versuchsreihe keine Wirkung. Im zweiten Durchgang wurden Zellen mit Thrombin stimuliert, die sowohl die PAR-1-Mutante, als auch einen intakten PAR-2 exprimierten. In dieser Konstellation konnte jedes Mal ein chemisches Signal als Antwort auf die Thrombin-Stimulation gemessen werden (O'Brien PJ et al, 2000).

In einer anderen Versuchsanordnung wurden Zellen, die beide intakte PAR-Typen (PAR-1 und PAR-2) auf der Zelloberfläche aufwiesen mit einem spezifischen PAR-1-Antagonisten behandelt. Hierdurch konnte jedoch lediglich nur 75% der chemischen Antwort auf Thrombin unterdrückt werden. Erst ein weiterer chemischer Schritt, bei dem isoliert die PAR-2-Rezeptoren zerstört wurden, vermochte das chemische Signal auf Thrombin zu 100% zu unterdrücken.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der gebundene Ligand des PAR-1 den PAR-2 zu aktivieren vermag.

Die Aktivierung der PARs wird nicht nur durch die Interaktion der Rezeptortypen der eigenen Gruppe beeinflusst, sondern darüber hinaus auch durch andere Membranproteine z.T. erleichtert. Hierunter sind zahlreiche Gerinnungsfaktoren, wie z.B. die aktivierten Faktoren FVa und FVIIa, die als komplexgebundene Formen mit dem Gewebefaktor (Tissue factor = TF) sowohl den PAR-1, als auch den PAR-2 aktivieren können (Camerer E. et al, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung der PARs von zahlreichen verschiedenen Bedingungen abhängig ist. Die Untersuchungen der Vergangenheit zeigten, dass viele verschiedene Proteasen diese Aktivierung in Gang setzen können.

Nachfolgend sind die Gruppen und Vertreter der potenziellen aktivierenden Proteasen aufgelistet:

#### 1. Gerinnungsfaktoren:

Serin Proteasen der Gerinnungskaskade sind die vielleicht am besten charakterisierten Aktivatoren der PARs (Coughlin SR et al, 2000; Riewald M et al, 2003). In dieser Gruppe sticht besonders Thrombin heraus, das den PAR-1, PAR-2 und den PAR-4 auf der Oberfläche von Thrombozyten aktivieren kann, was zur Thrombozytenaggregation führt und damit wesentlich zur Hämostase beiträgt.

Der TF-FVIIa-FXa Komplex führt zur Signalinitiierung durch Spaltung von PAR-1 und PAR-2 auf einer ganzen Reihe von verschiedenen Zelltypen. Hierzu gehören u.a. Endothelzellen, welche eine besondere Rolle im Rahmen von Entzündungsvorgängen einnehmen (Coughlin SR et al, 2000, Riewald M et al, 2001)

#### 2. Pankreatisches und extrapancreatisches Trypsin:

Trypsin ist ein potenter Aktivator des PAR-2 und des PAR-4. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass es mindestens drei genetisch verschiedene Trypsin-Arten im menschlichen Körper gibt: Trypsin I,

Trypsin II, sowie Mesotrypsin; das Trypsin IV ist hierbei kein eigenständiger Vertreter, sondern lediglich nur eine Splice-Variante des Mesotrypsins.

Das Potenzial von Trypsin vermittelt über den PAR-2, bzw. PAR-4 ein Signal in Gang zu setzen ist u.a. abhängig davon, in welcher Menge das Zymogen Trypsin freigesetzt wird. Entscheidend ist natürlich auch die Anwesenheit von der Enteropeptidase, die das Zymogen in seine aktive Form durch Spaltung überführt und letztlich auch von dem weiten Spektrum der endogenen Trypsininhibitoren. Während der Nahrungsaufnahme wird Trypsinogen I und II in das Lumen des Dünndarms sezerniert, wo dann die eigentliche Aktivierung durch die Enteropeptidase erfolgt. Die luminal Konzentration von Trypsin z.B. im Rattendarm während der Nahrungsaufnahme beträgt im Schnitt etwa 1µM. In dieser Konzentration ist das Trypsin mehr als ausreichend in der Lage den PAR-2 auf der apikalen Membran von Enterozyten zu aktivieren (EC50 ~5 nM) (Kong W et al, 1997). Trypsine werden von einer ganzen Reihe von Zellen exprimiert, wie z.B. Endothelzellen (Koshikawa N et al, 1998), epithelialen Zellen, Nervenzellen und Tumoren (Koivunen et al, 1989).

Trotz der im menschlichen Organismus weiten Verbreitung des extrapankreatischen Trypsins ist jedoch recht wenig über Steuerung der Sekretion und Aktivierung sowie dessen potenziellen Funktionen als PAR Aktivator bekannt.

Trypsin II wurde z.B. aus einer Kolonkarzinomlinie isoliert und ist imstande die dort auf der Oberfläche lokalisierten PAR-2 zu aktivieren. Auf Grund der Tatsache, dass diese Zelllinie sowohl Trypsin II produziert, als auch über PAR-2-Rezeptoren auf der Oberfläche verfügt, ist theoretisch eine regulatorische Funktion im Sinne einer autokrinen Steuerung möglich (Alm et al, 2000).

Trypsinogen IV wird u.a. von Epithelzellen, Endothelzellen und menschlichen Mukosazellen des Kolons produziert und freigesetzt. Gleichzeitig wird auf diesen Zellen der PAR-2 exprimiert. Das aktive Trypsin IV ist in der Lage den PAR-2 und PAR-4 zu spalten und zu aktivieren. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Trypsin IV durch die meisten Trypsininhibitoren nicht inaktiviert wird, was zu der Annahme führt, dass möglicherweise Trypsin IV für eine prolongierte Aktivierung zuständig ist (Katona G. et al, 2002).

### 3. Mastzelltryptase

Die Mastzelltryptase ist mengenmäßig das mit 25 % am häufigsten vorkommende Enzym in Mastzellen und ist deshalb als potenzieller Aktivator von PARs von besonderem Interesse. Zahlreiche der proinflammatorischen und mitogenetischen Effekte der Tryptase werden durch die Stimulation mit dem synthetisch hergestellten aktivierenden Peptid des PAR-2 imitiert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Tryptase ihre Wirkungen über diesen Rezeptor entfaltet. Über die Effektivität des Rezeptors liegen jedoch kontroverse Meinungen vor. Einerseits ist die Mastzelltryptase, isoliert aus verschiedenen Geweben und Zellen (Lunge, Haut und Mastzelllinien), in der Lage den PAR-2 zu spalten und diesen damit zu aktivieren (Akers et al, 2000; Berger P et al, 2001; Corvera CU et al, 1997).

Die Schlussfolgerung aus den bisherigen Untersuchungen ist, dass Tryptase ebenfalls den PAR-2 zu aktivieren vermag, jedoch bezüglich der Potenz und Effektivität hinter der Wirkung von Trypsin steht. In den meisten Untersuchungen wurde wahrscheinlich ein Gemisch aus den verschiedenen Tryptasearten verwendet. Die humane Mastzelltryptase besitzt mindestens fünf genetisch unterschiedliche Formen:  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\beta$ III, transmembranäre Tryptase, sowie weitere „Splice-Varianten“.

### 4. Leukozytenproteasen

Proteasen werden bei Entzündungsvorgängen von Leukozyten freigesetzt. Speichergranula von neutrophilen Granulozyten enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Proteasen, wie z.B. Cathepsin G, Elastase und Proteinase 3. Cathepsin G wird z.B. von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt und führt zur Thrombozytenaggregation. Diese Wirkung von Cathepsin G wird wahrscheinlich durch den PAR-4 vermittelt (Sambrano GR et al, 2000). Cathepsin G führt zu einem intrazellulären Calciumanstieg in PAR-4-exprimierenden Fibroblasten, Oozyten und Thrombozyten. Dieser Effekt lässt sich durch PAR-4-blockierende Antikörper verhindern.

Proteinase 3 befindet sich ebenfalls in neutrophilen Sekretgranula. Dieses Enzym ist ebenfalls dazu in der Lage Peptidfragmente des PAR-2 am extrazellulären N-Terminus abzuspalten. Über weitere

intrazelluläre Signalkaskaden resultiert ein Calciumanstieg in oralen Epithelzellen. Durch Abbau des PAR-2 lassen sich diese Wirkungen unterdrücken, so dass vermutet wird, dass Proteinase 3 ein weiterer Aktivator des PAR-2 ist (Uehara A. et al, 2002).

## 5. Zelloberflächenproteasen

Proteasen, die wie die Rezeptoren der PAR-Gruppe integrale Membranproteine darstellen, wurden ebenfalls als mögliche Aktivatoren ausgemacht. Hierzu zählt z.B. die Membrantyp Serin Protease 1 (MT-SP1: membrane-type serine protease 1). MT-SP1 ist ein Typ II integrales Membranprotein mit einer extrazellulären Proteasendomäne (Takeuchi T et al, 2000).

Die Analysen der Substratspezifität von MT-SP1 ergaben, dass der PAR-2 als ein potenzielles Substrat in Frage kommt. Beide Proteasen (Proteinase 3; MT-SP1) werden z.B. auf bestimmten Zelloberflächen coexprimiert (PC-3 Zellen z.B.). In Lösung gebrachte MT-SP1 zeigt in der Tat vermittelt über PAR-2 eine Signalinitiierung in Oozyten. Unbeantwortet bleibt die Frage, ob diese Protease auch unter physiologischen Bedingungen den PAR-2 aktivieren kann.

## 6. Artfremde Proteasen

Ungewöhnlicherweise wurden eine ganze Reihe von artfremden Proteasen ausgemacht, die ebenfalls in der Lage sind PARs zu aktivieren. Vertreter aus dieser Gruppe sind z.B. Proteasen von Milben, Bakterien und Pilzen. Die Staubmilben *Dermatophagoides* (= *Der*) *pteronysinus* und *Dermatophagoides farinae* produzieren eine Vielzahl von Proteasen (Cystein Proteasen, Trypsine, Chymotrypsine, Kollagenasen), die Allergene im respiratorischen Epithel darstellen. Der P3 und Der P9 stimulieren eine Zytokinfreisetzung aus menschlichem Respirationsepithel und induzieren hier eine Calciummobilisation, vergleichbar mit den Effekten vermittelt über den PAR-2 (Sun G et al, 2001).

Bakterielle Proteasen können ebenfalls PARs aktivieren. Ein humanpathogener Vertreter mit dieser Fähigkeit ist *Porphyromonas gingivalis*, der als Hauptverursacher der Parodontitis beim Menschen gilt. Die bakteriellen arginin-spezifischen Proteasen der Gingipain-Familien (RgpB und HRgpA) wurden ebenfalls als Mediatoren dieser Erkrankung ausgemacht.

RgpB und HRgpA können ebenfalls in PAR-1- und PAR-2 exprimierenden oralen menschlichen Epithelzelllinien eine Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 bewirken (Lourbakos A et al, 1998). Beide oben erwähnte Proteasen sind imstande über eine Aktivierung von PAR-1 und PAR-4 eine Calciummobilisation zu bewirken und mit einer vergleichbaren Potenz wie Thrombin eine Thrombozytenaggregation in Gang zu setzen (Lourbakos A et al, 2001).

Nachfolgende Untersuchungen, in denen die Aktivierung und Spaltung der PARs mittels Antikörper gehemmt wurden, belegten dass die Thrombozytenaggregation durch Gingipain-R über die PAR-Aktivierung gesteuert wird. Diese Ergebnisse lieferten neue Erkenntnisse und Betrachtungsweisen im Hinblick auf die Pathogenese der bakteriellen Infektion (Kauffmann HF et al, 2000).

### 1.1.2.3. Signaltransduktion

Untersuchungen der nativen proteinaseaktivierten Rezeptoren sowie Mutanten dieser Gruppe führten in der Vergangenheit zur Entwicklung einer guten Vorstellung über die Signaltransduktion dieser Rezeptorengruppe. Hierzu wurden ebenfalls zahlreiche Analysen mit dem synthetisch hergestellten aktivierenden Peptid (z.T. mit Abweichungen von der physiologischen Peptidsequenz) durchgeführt, um die essentiellen Strukturen und Bindungsdomänen innerhalb des Rezeptors zu charakterisieren, die für die Signaltransduktion unerlässlich sind. Die Schlussfolgerungen aus diesen Experimenten sind, dass die Interaktion einer bestimmten Region der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors und des gebundenen Liganden nach Proteolyse des Aminoterminus für die Signalinitiierung am PAR-1 und PAR-2 erforderlich ist.

Interaktionen zwischen dem gebundenen Liganden und dem PAR-1 wurden am humanen und am *Xenopus* PAR-1 untersucht (Gerszten RE et al, 1994). Die Liganden des humanen (SFLLRN) und des *Xenopus* (TRFIFD) PAR-1 sind spezifisch für ihre Rezeptoren und lassen sich hierdurch auch voneinander unterscheiden.

Dass nur bestimmte Abschnitte in der Abfolge der Aminoacidsequenz des gebundenen Liganden und der Ligandenbindungsdomäne der zweiten extrazellulären Schleife des PAR-1 die Spezifität bedingt, zeigte der Versuch, in dem lediglich der Austausch einer Aminosäure des *Xenopus*-Liganden (Phe<sub>87</sub> anstatt Asn) und einer Aminosäure im Bereich der extrazellulären Schleife (Glu<sub>260</sub> anstatt Leu) die *Xenopus*-PAR-1-Selektivität auf das humane aktivierende Peptid abänderte. Weitere Untersuchungen unterstützten die Vermutung, dass diese beiden Aminosäuren in dem extrazellulären Aminoterminus sowie in der zweiten extrazellulären Schleife für die Interaktion der gebundenen Ligandenbindungsdomäne entscheidend sind. Im Falle des humanen PAR-1 sind die für die Interaktion erforderlichen Aminosäuren-Reste im Bereich der extrazellulären Schleife Glu<sub>260</sub> und im Bereich des extrazellulären Liganden Arg<sub>5</sub>.

Eine weitere Veränderung der extrazellulären Schleife mit Austausch von 8 Resten ausschließlich in dieser Region führt darüber hinaus sogar zu einem PAR-1, der auch ohne die Anwesenheit von einem Liganden Aktivität zeigt. Dieser Umstand lässt vermuten, dass eine Konformationsänderung im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife für eine Signaltransduktion durch die Plasmamembran ausreichend ist.

Interaktionen zwischen dem gebundenen Liganden des PAR-2 und dem proteolytisch veränderten Rezeptor sind in ähnlicher Art durch synthetisch hergestellte PAR-1 und -2-Mutanten untersucht worden (Lerner DJ et al, 1996). Diese Studien zeigten ebenfalls die Wichtigkeit der zweiten extrazellulären Schleife für die Aktivierung des PAR-2. Die Schlüsselfunktion von bestimmten Aminosäuren-Resten im Bereich des Aminoterminus und der Bindungsdomäne sind mit Mutanten und Peptidanaloga für den PAR-2 untersucht und bestätigt worden (Al-Ani B et al, 1999).

#### Abhängigkeit der Aktivität von der Struktur der Bindungsdomäne

Die Beobachtung, dass synthetische Peptide korrespondierend zur Bindungsdomäne des PAR-1 potente Agonisten darstellen, die ohne die Notwendigkeit einer Proteolyse den Rezeptor aktivieren können, hat drei wichtige Konsequenzen:

1. Es ermöglicht den Einsatz von synthetisch hergestellten Peptiden zur Untersuchung der PAR-Funktionen, wodurch sich u.a. die recht unüberschaubaren Nebenwirkungen von Proteasen in einem biologischen System vermeiden lassen. Diese APs werden mittlerweile in sehr großem Umfang für in vivo und in vitro-Experimente genutzt.
2. Der Einsatz von APs ermöglicht bequeme Strukturaktivitätsuntersuchungen der Ligandenbindungsdomäne durch die funktionelle Analyse der synthetischen Peptide. Solche Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass ganz bestimmte Reste des gebundenen Liganden für die Aktivierung ausschlaggebend sind, was schließlich dazu führte die Selektivität der synthetisch hergestellten Peptide zu erhöhen (Hollenberg MD et al, 1997).
3. Analoga der AP wurden als Vorlagen genutzt, um Antagonisten des PAR-1 zu entwickeln (Andrade-Gordon et al, 1999).

Obwohl der Einsatz von aktivierenden Peptiden doch einige Vorteile mit bringt, sind diese im Vergleich mit den Proteasen doch recht schwache Agonisten an ihrem Rezeptor, was dazu führt, dass zur Stimulation z.T. sehr hohe Konzentrationen benötigt werden (>1µM). Dies rührt u.a. daher, dass die in der Versuchslösung befindlichen APs mit der Bindungsstelle des Rezeptors durch die Brownsche Molekularbewegung erst zufällig in Interaktion treten können. Im Gegensatz hierzu steht der vergleichsweise einfache Aktivierungsweg mit dem unmittelbar in Nachbarschaft befindlichen gebundenen Liganden. Darüber hinaus werden diese Peptide relativ schnell durch Proteolyse inaktiviert. Auf Grund der hohen erforderlichen Konzentrationen der Peptide, könnten diese auch zu unspezifischen Effekten im Versuchsansatz führen, die nicht auf die PAR-Aktivierung zurückzuführen sind. Deshalb ist bei allen Experimenten eine Kontrolle mit inaktiven Peptiden, z.B. mit reverser Aminosäuresequenz erforderlich.

Ähnlich wie bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt die Aktivierung der PARs zur intrazellulären Signaltransduktion über viele verschiedene Stoffwechselwege. Diese Mechanismen sind besonders gut für den PAR-1 und PAR-2 untersucht und in Übersichtsarbeiten veröffentlicht worden (Macfarlane et al, 2001).

#### Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die enzymatische Aktivierung der PARs hat zur Folge, dass auch eine sehr geringe Konzentration an Enzym (Aktivator) ausreicht, um nahezu alle Rezeptoren an der Zelloberfläche zu aktivieren, da Enzyme in der Regel aus einem Reaktionsschritt ohne Veränderung wieder hervorgehen und so wieder erneut ihre katalytische Aktivität aufnehmen können. Jedoch ergibt sich einerseits aus dieser Grundvorstellung und andererseits durch die Beobachtung, dass auch eine graduierte chemische Antwort auf PAR-Aktivierung möglich ist, die Frage, in welcher Art dieser Graduation der chemischen Antwort gesteuert wird. Im Falle einer neurotransmittervermittelten Rezeptoraktivierung bestimmt der Grad der Rezeptorbesetzung durch die Agonisten die Stärke der biochemischen Antwort. Bei den PARs ist dies abhängig von der Rate der enzymatischen Rezepterspaltung (Ishii K et al, 1993).

Im Falle der PAR-Aktivierung durch Thrombin führt dies zu einer Signaltransduktion via Hydrolyse von Phosphoinositol. Die Vermutung in diesem Falle ist, dass jede Rezepterspaltung ein bestimmtes Quantum an Phosphatidylinositol-Signal generiert. Die Signalgenerierung wird beendet, indem nach Phosphorylierung und anschließender Internalisierung des Rezeptors die Degradation erfolgt. Letztlich führen hohe Konzentrationen von Thrombin zu einer raschen Spaltung von zahlreichen PAR-1-Molekülen, wodurch proportional die Konzentration an Inositoltrisphosphat ansteigt und hierdurch die Signaltransduktion ermöglicht wird.

#### PAR-1 Signaltransduktion

Da in der vorliegenden Arbeit die Effekte des PAR-2 untersucht wurden, soll hier nur in groben Zügen auf die intrazellulären Signaltransduktionswege bei der PAR-1-Aktivierung eingegangen werden.

Allgemein lässt sich sagen, dass am Anfang der intrazellulären Signalübermittlung die Bindung der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit an den Rezeptor steht. Als  $G\alpha$ -Untereinheiten, die an PAR-1 binden werden, sind Gq11a, G12/13a und Gia identifiziert worden. In der Folge werden eine ganze Reihe von weiteren second Messenger-Pathways aktiviert (z.B.: Inositoltrisphosphat, Diacylglycerol, Rho,  $Ca^{2+}$ , usw.), die wiederum eine Vielzahl von Kinasen, Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren in Gang setzen, die letztlich zu den beobachteten Effekten führen (Thrombozytenaggregation, Migration, Proliferation, Sekretion, usw.)

#### PAR-2 Signaltransduktion

Die Signaltransduktionswege des PAR-2 sind nicht ganz in dem Ausmaß erforscht, wie diejenigen für den PAR-1. Die PAR-2-Aktivierung führt zur Freisetzung von Inositoltrisphosphat sowie zu einer Calciumfreisetzung in Enterozyten, Myozyten, Neuronen, Astrozyten und Tumorzellen (Böhm SK et al, 1996; Corvera CU et al, 1997; Kong W et al, 1997; Nystedt S et al, 1995). Auf Grund dieser Tatsache ist eine Kopplung des PAR-2 an ein Gq-Protein sehr wahrscheinlich. Ein weiterer Beleg hierfür ist die Beobachtung, dass die PAR-2-vermittelte Signalinitiierung nicht durch Pertussistoxin beeinflusst wird, was eine Signalvermittlung durch inhibitorische G-Proteine unwahrscheinlich macht (DeFea KA et al, 2000).

In Enterozyten und PAR-2 exprimierenden epithelialen Zellen führt eine PAR-2-Aktivierung zu einer Stimulation der Arachidonsäure-Freisetzung und einem raschen Anstieg der Prostaglandine E2 und F1 $\alpha$ . Diese Effekte werden vermutlich durch eine vorherige Aktivierung der Phospholipase A2 und der Zyklooxygenase-1 bewirkt.

Des Weiteren führen PAR-2-Aktivatoren zu einer starken Stimulation der MAP-Kinasen ERK1/2, sowie zu einer schwachen Stimulation der MAP-Kinase p38, obwohl die c-jun aminoterminal Kinase nicht aktiviert wird (Yu Z. et al, 1997):

Jüngste Beobachtungen zeigten, dass  $\beta$ -Arrestine eine wichtige Rolle in der PAR-2-induzierten ERK-Aktivierung spielen.  $\beta$ -Arrestine sind zytosolische Proteine, die mit den aktivierten membranständigen und zytosolischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren. Die Aktivierung des PAR-2 führt zu einer Organisation eines hochmolekularen Komplexes, bestehend aus dem PAR-2,  $\beta$ -Arrestinen,

raf-1 und aktiviertem ERK1/2, der sich entweder an der Plasmamembran oder in frühen Endosomen formiert (DeFea KA et al, 2000).

Dieser „Komplex“ bewirkt eine Konzentrierung von ERK1/2 im Zytosol, wo sie eine Proliferation induzieren können. In Zellen mit einer PAR-2-Mutante, die nicht in der Lage ist mit  $\beta$ -Arrestinen zu interagieren, ist die Entstehung eines solchen Komplexes nicht möglich. In diesen Zellen führen PAR-2-Agonisten zu einer Aktivierung der ERK1/2 über einen alternativen Signalweg, der eine nukleäre Translokation bewirkt und schließlich zu einem Proliferationsreiz führt. Zusammenfassend lässt sich über die Funktion der  $\beta$ -Arrestine sagen, dass sie gewissermaßen ein wichtiges Bindeglied bei der Bildung des ERK1/2-Moduls an der Plasmamembran, bzw. in den Endosomen darstellen. Dieser Komplex führt zu einer Lokalisation des aktivierten ERK1/2 an der Plasmamembran/ in den Endosomen, wo es dann Einfluss auf die Regulation von zytosolischen Zielmolekülen haben kann.

Darüber hinaus bewirken PAR-2-Agonisten eine Aktivierung des NF $\kappa$ B-Stoffwechselweges in Keratinozyten und Myozyten, wodurch ein bedeutender Einfluss des PAR-2 im Rahmen von Entzündungsvorgängen vermutet werden kann (Bretschneider et al, 1999; Kanke T. et al 2001).



Abb. 3:

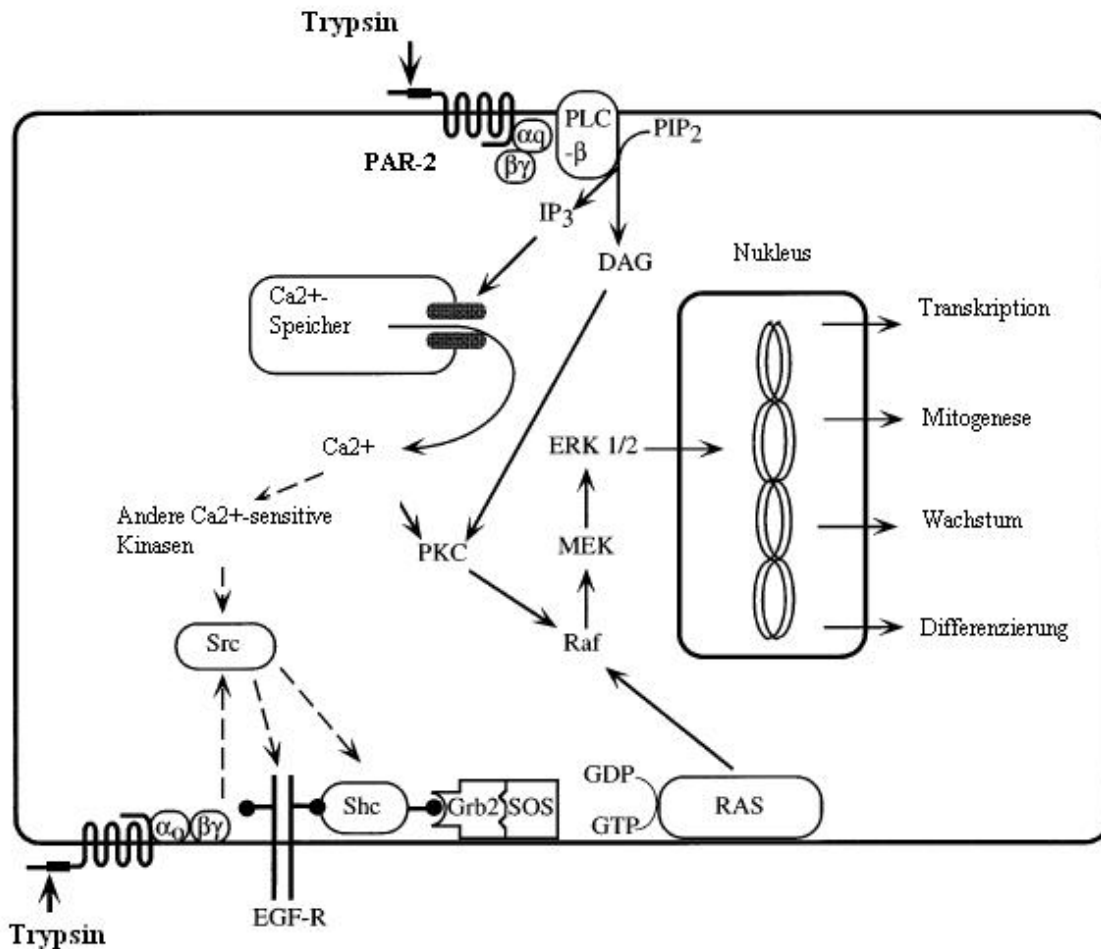


Abb. 3 (Dery, O. et al, 1998): Mechanismus der Signaltransduktion durch Proteinase aktivierte Rezeptoren

Durch Spaltung des N-Terminus mit nachfolgender Anlagerung des gebundenen Liganden an die Bindungsdomäne des PAR-2 kommt es zu einer Konformationsänderung, die zur Abspaltung der aktivierenden G-Proteinuntereinheit führt. Die benachbarte PLC führt zu einer Signaltransduktion via second messengern (IP3 + DAG). Einerseits durch Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und Aktivierung calciumsensitiver Kinasen und andererseits durch Aktivierung der PKC mit Anstoß der Raf/MEK/ERK-Kaskade werden unterschiedliche Prozesse in der Zelle initiiert (Transkription, Mitogenese, Wachstum, Differenzierung).

Abkürzungen:

**PLC:** Phospholipase C; **PIP:** „Phosphatidylinositolbisphosphat“; **IP:** Inositoltrisphosphat; **DAG:** Diacylglycerol; **ERK:** Extracellular-Signal-Regulated-Kinase; **MEK:** mitogen-aktivierte protein Kinase; **PKC:** Proteinkinase C; **EGF:** epidermal growth factor.

**Shc:** Src homology 2 domain containing; **Raf** (Mitglied der Rho-GTPasen); **SOS**

(Son-of-Sevenless), **Grb2:** Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2

**GDP / GTP:** Guanosindiphosphat / Guanosintriphosphat

### 1.1.2.3 Signalterminierung

Verschiedene Mechanismen sind an der Signalterminierung der PARs beteiligt.

Die direkte proteolytische Spaltung der Rezeptoren an der Zelloberfläche ist ein Weg.

Proteasen, die den gebundenen Liganden oder die Bindungsdomäne in der zweiten extrazellulären Schleife enzymatisch spalten, würden hierdurch einen Rezeptor generieren, der nicht in der Lage ist

auf aktivierende Proteasen zu reagieren. Es gibt eine ganze Reihe von Proteasen, die hierzu imstande sind. So ist das Potenzial inaktivierender Enzyme bei der Untersuchung und Betrachtung der Signalterminierung der PARs mit zu berücksichtigen. Diese Art von Proteasen könnte dazu dienen, das Signal der aktivierenden Proteasen zu dämpfen.

Proteasen von Entzündungszellen, wie z.B. von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen, können PARs spalten und deaktivieren. Weitere Enzyme, die nach Spaltung des PAR-1 die Aktivierung durch Thrombin verhindern, sind neutrophiles Cathepsin G, Elastase und Proteinase 3 (Molino M, et al, 1995; Renesto P et al, 1997).

In den o.a. Fällen ist das synthetisch hergestellte Peptid immer noch in der Lage den Rezeptor zu aktivieren, so dass man davon ausgehen muss, dass die Peptidbindungsregion der zweiten extrazellulären Schleife von der enzymatischen Spaltung nicht betroffen wird.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden auch beim PAR-2 bei der Behandlung mit Elastase und Cathepsin G beobachtet (Dulon S. et al, 2003).

Einige Proteasen können PARs an mehreren unterschiedlichen Stellen spalten, sowohl im Sinne einer Aktivierung, als auch Inaktivierung. Das Resultat der enzymatischen Wirkung, d.h. Rezeptorinaktivierung oder Freisetzung des aktivierenden Liganden ist dann in diesen Fällen abhängig von der enzymatischen Effizienz an der jeweiligen Stelle.

Zum Beispiel ist Cathepsin G in der Lage den PAR-1 an der Aktivierungsseite zu spalten (Arg41-Ser42), jedoch liegt die eigentliche enzymatische Potenz im Bereich der Peptidsequenz Phe55-Trp56, die zur Entfernung des gebundenen Liganden und damit zur Inaktivierung des Rezeptors führt.

Vergleichbare Effekte und Wirkungen sind auch für Trypsin beschrieben worden. So ist Trypsin in der Lage den PAR-1 zu spalten und zu aktivieren. Ebenso spaltet Trypsin den Rezeptor an weiter distal gelegenen Stellen, so dass der gebundene Ligand hierdurch entfernt wird und der Rezeptor letzten Endes inaktiviert wird.

Ein weiterer Weg bei der Internalisierung und konsekutiven Rezeptorinaktivierung, bzw. bei der Signalterminierung ist die Degradation des Rezeptors nach erfolgter Aktivierung. Würde keine Signalterminierung auf diesem oder auf anderem Weg erfolgen, würde es auf Grund der physiologischen Besonderheit im Rahmen des Aktivierungsprozesses zu einer wesentlich prolongierten Signaltransduktion kommen. Ist der extrazelluläre N-Terminus durch die aktivierende Protease einmal gespalten und der gebundene Ligand freigesetzt, so wäre prinzipiell nach Anlagerung des Liganden an die zweite extrazelluläre Schleife eine ununterbrochene Signaltransduktion möglich.

Die Mechanismen, die letztlich zur Inaktivierung des Rezeptors führen gleichen größtenteils dem allgemein bekannten Inaktivierungsvorgang im Sinne einer Rezeptordegradation wie bei vielen Rezeptorvertretern aus der Gruppe der GPCR, so z.B. detailliert beschrieben für Rhodopsin und für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor (Böhm SK, et al, 1997).

Im Folgenden ist der allgemeine Mechanismus der Rezeptordegradation dargestellt:

Abb. 4:

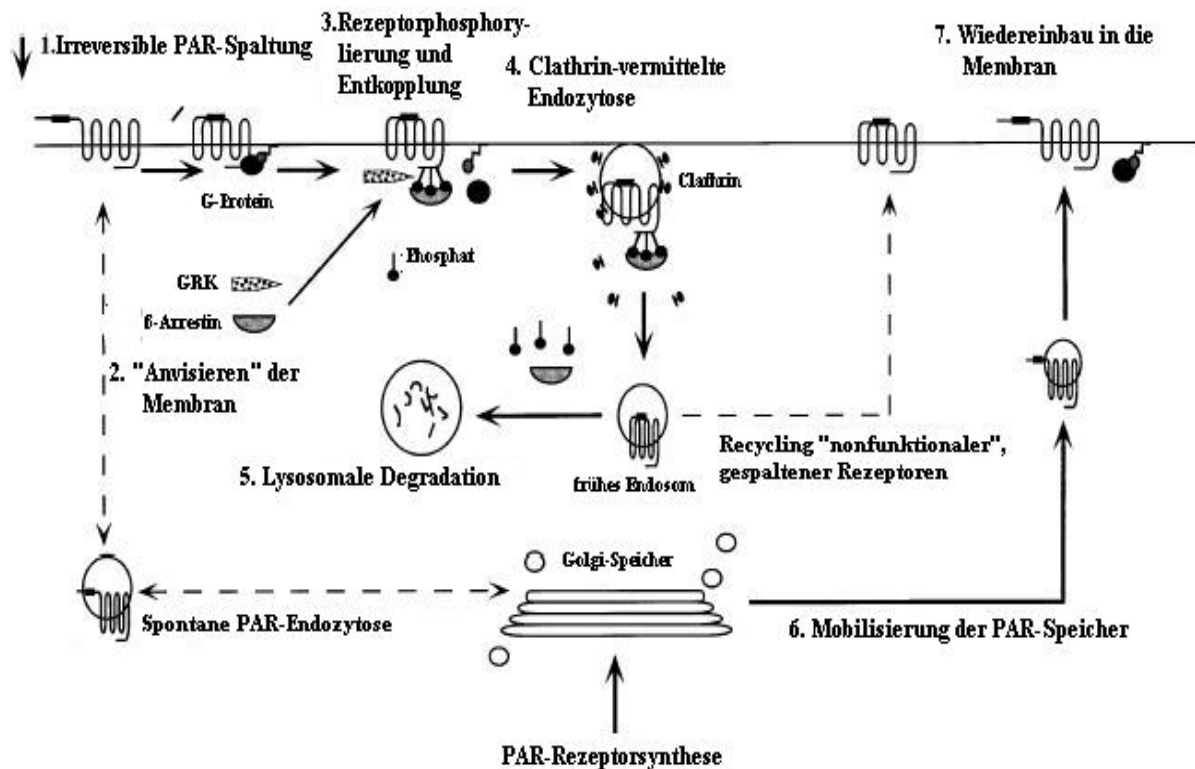


Abb. 4, (Dery, O. et al, 1998):

Rezeptordegradation des PARs:

1. PARs werden durch eine irreversible, proteolytische Spaltung aktiviert.
2. Die Aktivierung führt zu einer Anlagerung von G-Protein Rezeptorkinasen und -arrestinen, wie auch bei anderen G-Proteinen
3. Rezeptorphosphorylierung durch GRKs
4. Clathrin-vermittelte Endozytose des Rezeptors. Arrestine dienen wahrscheinlich in diesem Zusammenhang als Adapter-Moleküle für das Clathrin
5. Lysosomale Degradation des Rezeptors. Ein anderer Teil wird als nonfunktionaler Rezeptor wieder in die Membran eingebaut.
6. Mobilisierung der PARs aus dem Pool des Golgi-Speichers
7. Spontane PAR-Endozytose

### 1.1.3. Physiologie und Funktionen der PARs

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zur Charakterisierung der PAR-Funktionen und -Einflüsse in den Organsystemen durchgeführt. Ein dem derzeitigen Kenntnisstand entsprechende vollständige Liste aller bekannten Funktionen hier wiederzugeben würde den Rahmen dieser Arbeit deutlich überschreiten, weshalb an dieser Stelle, neben einer Darstellung einer eingeschränkten Auswahl wichtiger Funktionen der Verweis auf die Literatur gegeben sei (z.B. ausführliche Liste in dem Review-Artikel von Steinhoff und Ramachandran (Ramachandran et al, 2012; Martin Steinhoff et al, 2005).

Viele Untersuchungen zu den physiologischen und pathophysiologischen Funktionen wurden an PAR-defizienten Mäusen durchgeführt (C. T. Esmon et al, 2005; Hamilton J. R. et al, 2000).

Wenn man die Daten aus diesen Untersuchungen mit den Proteinasen, PAR-aktivierenden Peptiden sowie PAR-Gen-defizienten Mäusen zusammen nimmt, ergibt sich hieraus die Erkenntnis, dass PARs eine entscheidende Rolle in der Regulation verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge bei Säugetieren spielen.

#### **1.1.3.1. PAR-1-Funktionen**

Wie oben beschrieben wird der PAR-1 u.a. durch Thrombin aktiviert. Neben den bekannten Funktionen des Thrombins in der Gerinnungskaskade wurde herausgefunden, dass es eine multifunktionale Rolle im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, Allergien, Tumor-Wachstum, Gewebe-Remodelling, Thrombosen und wahrscheinlich in der Wundheilung besitzt (Macfarlane et al, 2001; Coughlin SR et al, 2000; Coughlin SR et al, 2001; Cirino G et al, 2000).

Nachdem der Thrombinrezeptor geklont wurde, erkannte man, dass viele der zellulären Wirkungen des Thrombins (wie z.B. die Thrombozytenaggregation, Angiogenese, endotheliale Zellpermeabilität, Vasokonstriktion, Genregulation und Immunmodulation) wahrscheinlich auf die Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors zurückgeführt werden müssen (Sugama Y et al, 1992; Sambrano GR et al, 2001).

##### **1.1.3.1.1. PAR-1 und das kardiovaskuläre System**

Eine Reihe von Untersuchungen konnte zeigen, dass Thrombin und andere Agonisten von PAR-1 den Gefäßtonus beeinflussen können. In diesem Zusammenhang hatte man vor der Entdeckung des PAR-1 beobachtet, dass Thrombin den Gefäßtonus über einen endothelabhängigen Mechanismus mittels NO-Freisetzung beeinflussen kann (Muramatsu I et al, 1992). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass dieser Thrombin-vermittelte Effekt über die Aktivierung des PAR-1 erfolgt. Darüber hinaus bewirken Thrombin und PAR-1-Agonisten eine Kontraktion glatter Muskelzellen durch einen Effekt, der den Einstrom von extrazellulärem Calcium benötigt (Muramatsu I et al, 1992).

In Untersuchungen mit Koronarien und Aorta-Präparationen hingegen führt eine PAR-1-Aktivierung zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur (Ku DD et al, 1986).

Neuere Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass Thrombin und PAR-1 eine wichtige Rolle in der Regulation des gesunden und atherosklerotischen Endotheliums spielt. In gesunden humanen Arterien ist der PAR-1 überwiegend auf das Endothel beschränkt, wohingegen in arteriosklerotischen Bereichen mit Entzündungsaktivität die Expression deutlich erhöht ist (Nelken NA et al, 1992).

Thrombin und PAR-1 Agonisten verursachen eine schnelle, jedoch vorübergehende Kontraktion der Endothelzellen in verschiedenen Geweben, welche letztlich zu einer gesteigerten Permeabilität für Plasmaproteine und Entzündungszellen führt. Zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Zytokine, Kinine und biogene Amine (Garcia JG et al, 1993) sind in diese regulativen PAR-1 gesteuerten Prozesse involviert.

Ebenso konnte der entscheidende Einfluss des PAR-1 auf die vaskuläre Ontogenese gezeigt werden. Etwa 50 % PAR-1 – defizienter Mäuse starben in der mittleren Fetalperiode infolge diffuser multipler Blutungen. Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass der PAR-1 für eine normale Gefäßentwicklung erforderlich ist und maßgeblich die Hämostase in Mäusen beeinflusst (Carmeliet P et al., 2001).

Cook et al untersuchten die Rolle des PAR-1 in intravaskulären Thrombusformationen in einem experimentellen Modell einer arteriellen Thrombose bei Meerkatzen-Affen. Durch Einsatz eines PAR-1 blockierenden Antikörpers konnte diese Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die Thrombin stimulierte Aggregation der Thrombozyten sich drastisch reduzieren ließ. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine spezifische Blockade der PAR-1- Aktivierung durch Thrombin das Auftreten arterieller Thrombosen wirksam verhindern kann, ohne hierbei signifikant andere Parameter der Hämostase zu beeinflussen (Cook JJ et al., 1995). Diese Daten lassen vermuten, dass der PAR-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Thrombosen spielt und auf Grund der bisherigen Untersuchungen ein attraktiver

Kandidat für eine weitere Klasse von Thrombozytenaggregationshemmern in der Behandlung des Myokardinfarkts, der Atherosklerose und der Thrombose ist.

#### **1.1.3.1.2. PAR-1 und Thrombozyten**

Die Aktivierung der Thrombozyten mittels Thrombin, bzw. durch das PAR-1 aktivierende spezifische Peptid führt zu einem Calciumeinstrom. In der Folge kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts mit Thrombozytenaggregation und Thromboxanproduktion (Vassallo Jr RR et al, 1992; Henriksen RA et al., 2002). Darüber hinaus führt die PAR-1 Aktivierung auf der Oberfläche der Thrombozyten zu einer ganzen Reihe von weiteren Prozessen, die in ihrer Gesamtheit den Vorgang der Gerinnung maßgeblich mit steuern (Andersen H et al, 1999).

Die Anzahl der PAR-1 auf der Thrombozytenoberfläche beträgt schätzungsweise 1500 pro Thrombozyt (Brass LF et al, 92).

#### **1.1.3.1.3. PAR-1 und Immunzellen**

Vor einiger Zeit wurde vermutet, dass Serin-Proteasen und PARs eine wichtige Rolle in der Modulation der Leukozytenfunktion haben (Altieri DC et al, 1995). Bis heute gibt es leider nur wenige Daten über die PAR-gesteuerte Regulation des Immunsystems und der Entzündungsprozesse. Jedoch gibt es gute Untersuchungen bezüglich der PAR-vermittelten Einflüsse auf die Monozytenbeweglichkeit und Chemotaxis, Modulation der Zytokinantwort, den Beitrag zur Proliferation der mononukleären Zellen und die Beeinflussung der Apoptoseinduktion in verschiedenen Immunzellen (Szaba FM et al, 2002; Naldini A. et al, 1998).

Weiterhin wurden Thrombin-Rezeptoren ebenfalls auf der Oberfläche von humanen T-Lymphozyten nachgewiesen (Mari B. et al, 1996). Die Rezeptor-Subtypen (PAR-1-4) wurden bisher jedoch noch nicht charakterisiert. Ferner konnte man nachweisen, dass humanes  $\alpha$ -Thrombin in fünf verschiedenen T-Lymphozyten die intrazelluläre Calciumkonzentration zu erhöhen vermag und die Protein Kinase C (PKC) aktiviert, wohingegen Thrombinrezeptoren in B-Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass PARs die T-Zell-Funktion bei Entzündungsvorgängen und Immunantworten regulieren können (Tordai A. et al, 1993).

Granzyme A aus zytotoxischen und Helfer-T-Zellen scheint ebenfalls mit dem PAR-1 in Astrozyten zu interagieren. Interessanterweise blockiert Granzyme A die Thrombin-induzierte Plättchenaggregation durch Spaltung des PAR-1. Diese Spaltung selbst führt jedoch nicht zu einer Signaltransduktion. Dies könnte bedeuten, dass zwar Granzyme A mit dem PAR-1 zu interagieren vermag, jedoch lediglich im Sinne einer Deaktivierung. Letztlich könnte diese Beobachtung bedeuten, dass eine Freisetzung von Granzyme A während Entzündungsvorgängen innerhalb von Blutgefäßen eine unmittelbare Thrombozytenaggregation verhindert (Suidan HS. Et al, 1996 ).

PAR-1 moduliert die Chemotaxis in inflammatorischen Zellen. Neben der Beeinflussung der IL-8-Sekretion, induziert Thrombin die Produktion des Monozyten chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Monozyten, wahrscheinlich auch vermittelt über den PAR-1 (Colotta F et al, 1994; Kaplanski G et al, 1997).

Außerdem induziert eine PAR-1-Aktivierung in Monozyten die Bildung von IL-1 und IL-6. Diese Zytokine sind u.a. bekannt dafür, dass sie eine Angiogenese bewirken, weshalb man auch einen Einfluss des PAR-1 auf Angiogenese und Gewebereparatur vermuten kann (Naldini A. et al, 2000).

Da Thrombin über die PAR-1- Aktivierung zur Chemotaxis der humanen LGL-Zellen (Large granular lymphocyte) führt, vermutet man auch einen triggernden Einfluss des PAR-1 bei chronischen Entzündungskrankheiten, wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis (Morris R. et al, 1996, Shin H et al, 1995).

#### **1.1.3.1.4. PAR-1 und das respiratorische System**

Verschiedene Zellen in den Atemwegen von Säugetieren wie z.B. Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten exprimieren in hoher Zahl den PAR-1 auf ihrer Zelloberfläche. Mehrere neue Arbeiten lassen vermuten, dass der PAR-1 eine wichtige pathophysiologische Funktion im

Zusammenhang mit entzündlichen Lungenkrankheiten wie der neutrophilen Alveolitis, der pulmonalen Fibrose und des Asthma besitzt (Walker TR et al, 1998; Chambers RC et al, 1998; Shimizu S et al, 2000; Ludwicka-Bradley A et al, 2000).

In den Atemwegen verschiedener Spezies übernimmt der PAR-1 eine Doppelfunktion, in dem eine Stimulation sowohl zu einer Kontraktion als auch zu einer Relaxation führt. Zum Beispiel erzeugt eine Stimulation des PAR-1 in humanen Bronchien eine Kontraktion. In der Trachea von Mäusen kommt es hingegen nach Aktivierung sowohl zu einer Kontraktion als auch zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (Lan RS et al, 2000; Lan RS et al, 2001). In diesen Versuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass die Stimulation mit Trypsin, Thrombin und Peptid-Agonisten für den PAR-1, PAR-2 und PAR-4 eine relaxierende Antwort in trachealen glatten Muskelzellen erzeugte, die durch Prostanoid, wie z.B. PGE<sub>2</sub> vermittelt wurde. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz von Indomethacin, einem Zykllooxygenase-Inhibitor (COX-2-Inhibitor), und einem Prostanoid-Rezeptor-Antagonisten (AH 6809) wieder rückgängig gemacht.

Synthetische Peptide für den PAR-1 und PAR-4 induzieren eine schnelle, transiente und kontraktile Antwort, die der relaxierenden Wirkung vorangeht.

#### **1.1.3.1.5. PAR-1 und der Gastrointestinaltrakt**

Der PAR-1 wurde nachgewiesen in der Lamina propria, der Submukosa, den Endothelzellen und auf Zellen des autonomen Nervensystems des GI-Traktes. Im Magen-Darm-Trakt findet sich eine relativ hohe Expression der PAR-1 mRNA verglichen mit anderen Geweben (Böhm SK et al, 1996; de Garavilla L et al, 2001; Buresi MC et al, 2001; Vergnolle N, 2000).

Die Funktion des PAR-1 als ein Rezeptor der thrombininduzierte Effekte auf den Gastrointestinaltrakt vermittelt, ist bis heute noch nicht vollkommen verstanden, da Thrombin abgesehen vom PAR-1 ebenfalls mit dem PAR-3 und PAR-4 interagieren kann (Vergnolle N et al, 2005). Zahlreiche Studien legen die Vermutung nahe, dass der PAR-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Magen-/Darmmotilität spielt. In Meerschweinchen führt eine Aktivierung des PAR-1 abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration zu einer Kontraktion der longitudinalen glatten Muskulatur (Hollenberg MD et al, 1992; Saifeddine M et al, 2001). Im Mäusedarm lässt sich durch PAR-1-Agonisten die Funktion von L-Typ-Calciumkanälen beeinflussen und hierüber eine Kontraktion der Muskulatur auslösen (Kawabata A et al, 2001).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Ratten beobachtet (Mule F et al, 2002).

In Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation des PAR-1 zur Beeinflussung der Proteine der extrazellulären Matrix (z.B. Laminin, Kollagen IV und Fibronektin) führte (Rudroff C et al, 2001).

In anderen Untersuchungen konnte heraus gearbeitet werden, dass der PAR-1 Einfluss auf diverse intestinale Sekretionswege hat. Buresi et al konnten zeigen, dass eine selektive Stimulation mit PAR-1-Agonisten zu einer Calcium-abhängigen Chloridsekretion in intestinalen Epithelzellen führte (Buresi MC et al, 2001). Diese PAR-1 induzierte intestinale Chlorid-Sekretion involviert das Protein Tyrosin Kinase SRC (Src), den epidermal growth factor (EGF) Rezeptor (EGFR), die Aktivierung der MAPK Signalwege, die Phosphorylierung der zytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) und die Zykllooxygenaseaktivität. Die Anwesenheit eines funktionstüchtigen PAR-1 im intestinalen Epithelgewebe und die Tatsache, dass eine PAR-1-Aktivierung zu einer Ionensekretion führt, lässt vermuten, dass der PAR-1 eine wichtige Funktion bei der Regulation der intestinalen Barriere besitzt. Die PAR-1-Aktivierung auf intestinalen Oberflächen könnte zu einer sekretorischen Antwort führen, die zur Entstehung von Diarrhoen als ein Symptom der intestinalen Entzündung beiträgt.

Weitere Untersuchungen unterstützen diese Hypothese, dass der PAR-1 eine wichtige Funktion bei der intestinalen Inflammation besitzt. Es wurde gezeigt, dass die Gabe von PAR-1-Agonisten im Kolon eine Entzündung verursacht und letztlich eine Störung der Intestinalen Barrierefunktion auslöst (Chin AC et al, 2003). Wenn man die derzeitige Datenlage hinsichtlich der PAR-1 Funktion im Magen-Darm-Trakt zusammen nimmt, besitzt der PAR-1 eine proinflammatorische Funktion (Kawabata A et al, 1999). Letztlich sind hier jedoch weitere Untersuchungen mit PAR-1-Antagonisten und z.B. PAR-1-defizienten Mäusen notwendig um die pathogenetische Funktion des PAR-1 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu verstehen.

#### **1.1.3.1.6. PAR-1 und der Urogenitaltrakt**

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass der PAR-1 auch im Rahmen von renalen Entzündungsprozessen, wie z.B. der Glomerulonephritis, eine wichtige Rolle spielt (Cunningham MA et al, 2000).

In „Wildtyp“-Mäusen, die mit Hirudin behandelt wurden (einem direkten Thrombin-Inhibitor, der eine hohe Spezifität und starke Bindungsaffinität besitzt), konnte der proinflammatorische PAR-1 vermittelte Effekt signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse konnten bei PAR-1-defizienten Mäusen bestätigt werden. Bei einer Behandlung mit dem PAR-1-Agonisten hingegen nahm die inflammatorische Antwort zu, so dass der PAR-1 vermutlich eine wichtige Funktion bei der Regulation renaler Entzündungsprozesse besitzt. Unglücklicherweise vermag das PAR-1-Peptid (SFLLRN-NH<sub>2</sub>) ebenfalls mit einer vergleichbaren Potenz den PAR-2 zu aktivieren, so dass nicht mit letzter Sicherheit zwischen PAR-1- und PAR-2 vermittelten proinflammatorischen Effekten in o.g. Arbeit differenziert werden konnte.

#### **1.1.3.2. PAR-2-Funktionen**

Der PAR-2 ist ebenfalls wie der PAR-1 im menschlichen Körper weit verbreitet. Nachgewiesen wurde eine Expression in Gehirn, Hinterstrangganglien, Augen, Herz, Respirationstrakt, GI-Trakt, Pankreas, Nieren, Leber, Ovarien, Testes und in der Haut (Böhm SK et al, 1996; Nystedt et al, 1995; Steinhoff M et al, 2000; Hou L et al., 1998; Frungieri MB et al, 2002). Darüber hinaus gelang ein Nachweis des Rezeptors in diversen Zelltypen, wie z.B. Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Osteoblasten, wie auch Immunzellen (T-Zellen, Neutrophile Granulozyten, Mastzellen oder Eosinophile) (Literaturquelle s.o.). In Thrombozyten hingegen konnte eine Expression nicht nachgewiesen werden (Hwa JJ et al, 1996).

In zahlreichen Arbeiten der vergangenen Jahre wurde eine wichtige Funktion des PAR-2 in vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beschrieben. Welche Enzyme außer den bisher bekannten (s.o. Kapitel 1.1.2.2.) den Rezeptor ebenfalls zu aktivieren vermögen, bleibt weiterhin zu erforschen. Viele trypsin-ähnliche Enzyme könnten diesen Rezeptor am extrazellulären N-Terminus spalten und damit aktivieren.

Die Expression und das Translationsprodukt der Trypsinogen-2 mRNA wurde in Endothelzellen nachgewiesen (Koshikawa N et al, 1997). Interessanterweise können verschiedene Arten humaner Krebszelllinien Enzyme sezernieren, die einen trypsinähnlichen Charakter besitzen, so dass auch diese Zellgruppe den PAR-2 aktivieren könnte (Koshikawa N et al, 1997). In humaner Haut produzieren Keratinozyten Trypsinogen-4, das in vitro ebenfalls den PAR-2 aktivieren kann (unveröffentlichte Daten vom M. Steinhoff). Ein anderer Kandidat für die PAR-2-Aktivierung ist wie oben erwähnt die Mastzelltryptase. Die Beobachtung, dass die Tryptase den PAR-2 zu aktivieren vermag legt den Schluss nahe, dass dieser Rezeptor beim Menschen eine wichtige Rolle spielt, bei denen die Mastzelltryptase involviert ist, wie z.B. während Entzündungen, Hypersensitivitätsreaktionen und der Wundheilung (Steinhoff M et al, 1999; Biedermann T et al, 2000). Die Fähigkeit der humanen Tryptase den PAR-2 zu aktivieren scheint jedoch durch eine Rezeptorglykosylierung am N-terminalem Ende in Nähe der Stelle für die aktivierende Rezeptorspaltung eingeschränkt zu sein (Compton SJ et al, 2001, Compton SJ et al, 2002). Trotz dieser Beobachtung ähneln die Effekte ausgelöst durch den Einsatz der Tryptase im Versuch häufig denen einer PAR-2-Aktivierung. Die Mastzelltryptase führt nämlich zu einer Steigerung der IL-1-beta und IL-8-Sekretion, erhöht die Expression von intrazellulären Adhäsionsmolekülen, erzeugt eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile und eosinophile Granulozyten, verursacht eine erhöhte Gefäßpermeabilität und stellt einen Proliferationsreiz für Epithelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen dar (Brown JK et al, 1995; Brown JK et al, 1995; Vergnolle N et al, 1999; Shpacovitch VM et al, 2002). Weiterführende Untersuchungen dieser über die Mastzelltryptase ausgelösten, vermutlich PAR-2-vermittelten Effekte, stehen zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

#### **1.1.3.2.1. PAR-2 und das kardiovaskuläre System**

Im Gefäßsystem scheint der PAR-2 einige, vor allem proinflammatorische Effekte zu besitzen. Agonisten des PAR-2 induzieren eine Relaxation in der Aorta der Ratte und in den Koronarien des Schweins abhängig von der Aktivität der endothelialen NO-Synthese (Al Ani B et al, 1995; Hwa JJ et al, 1996; Saifeddine M et al, 1996). Dass diese PAR-2 vermittelte Relaxation der Gefäße über endothelabhängige biochemische Signale ausgelöst wird, wurde durch die Arbeit von Komuro et al. weiter gestützt. Nach Entfernung der Endothelschicht von Kaninchen-Gefäßen (Kaninchen-Aorta), wurde nach Stimulation mit Trypsin anstelle einer Relaxation eine Kontraktion beobachtet (Komuro T et al, 1997). Die i.v.-Injektion von PAR-2-Agonisten bei lebenden Ratten führte zu einem signifikanten Blutdruckabfall, der auf die Freisetzung von NO aus dem Endothel zurückgeführt wurde (Hwa JJ et al, 1996). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass PAR-2-Agonisten die IL-6-Produktion erhöhen, die Freisetzung des von Willebrand-Faktors induzieren und als Proliferationsreiz für HUVEC-Zellen dienen (HUVEC = human umbilical vein endothelial cells) (Mirza H et al, 1996; Storck J et al, 1996). Außerdem wurde demonstriert, dass einige inflammatorische Mediatoren in der Lage sind die Expression des PAR-2 in Endothelzellen zu beeinflussen. In HUVEC führen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  zu einer Steigerung der mRNA-Expression des PAR-2 (Nystedt S et al, 1996). Für die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  ist bekannt, dass sie eine bedeutende Rolle in der Steuerung von akut entzündlichen Prozessen besitzen. Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass der PAR-2 im Gefäßsystem zu einer Gefäßdilatation führt, die Extravasation von Plasmaproteinen fördert und ein Proliferationsreiz für Endothelzellen im kardiovaskulären System darstellt. PAR-2 könnte also als vaskulärer Sensor für trypsinähnliche Proteinasen in der Gerinnungskaskade fungieren.

#### **1.1.3.2.2. PAR-2 und das Immunsystem**

Obwohl bereits einige Informationen über die Rolle des PAR-2 in Epithel und Endothel gewonnen wurden, gibt es vergleichsweise wenige Erkenntnisse über die Funktion dieses Rezeptors im Immunsystem. Die PAR-2-Expression ist in verschiedenen Zelltypen des Immunsystems nachgewiesen worden (z.B. T-Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten und Mastzellen (D'Andrea MR et al, 2000); Nishikawa H et al, 2000; Mari B et al, 1996; Miike S et al, 2001).

Es finden sich einige Untersuchungsergebnisse, die darauf hinweisen, dass der PAR-2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Leukozytenfunktion besitzt. Einige dieser Beobachtungen über das PAR-2 – beeinflusste Verhalten von Leukozyten wurden bei lebenden Nagern gemacht (Miike S et al, 2001). In diesen Versuchsansätzen wurde berichtet, dass eine intraperitoneale Applikation des PAR-2-aktivierenden Peptides (SLIGRL-NH<sub>2</sub>) zu einem deutlichen Anstieg der Leukozytenmigration in die Peritonealhöhle führte. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass das PAR-2-AP durch einen Mechanismus, der die Freisetzung des platelet-activating-factors bewirkt, einen relevanten Anstieg der Leukozytenadhärenz verursacht (Lindner JR et al, 2000).

Linder et al konnten in einem Versuch mit PAR-2-defizienten Mäusen nachweisen, dass diese Tiere in einem akuten Entzündungsprozess, ausgelöst durch ein Gewebetrauma im Vergleich mit „Wildtyp“-Mäusen eine deutlich erniedrigte Leukozyteneinwanderung aufwiesen. Howells et al. berichteten, dass das PAR-2 –AP, wie auch das Trypsin dazu in der Lage sind, den PAR-2 auf humanen neutrophilen Granulozyten zu aktivieren. Die PAR-2-Aktivierung führt zu einer Formveränderung der Granulozyten in Verbindung mit einer vermehrten Expression des CD 11b/CD 18 (Howells GL et al, 1997). In einer gemeinsamen Kultur bestehend aus Endothelzellen und humanen Neutrophilen, induzierte das PAR-2-AP eine vermehrte Expression des Leukozytenadhäsionsrezeptor L-Selektin und ebenfalls von CD11b/CD18-Rezeptoren (Lindner JR et al, 2000 ).

Lourbarkos et al. gelang der Nachweis, dass eine bakterielle Proteinase, das Gingipain-R aus *P.gingivalis*, den PAR-2 auf humanen neutrophilen Granulozyten aktivieren kann. Da viele fakultativ pathogene Bakterien beim Menschen Serinproteasen mit trypsinähnlicher Aktivität produzieren, kann angenommen werden, dass bestimmte pathogene Effekte von Bakterien über den PAR-2 vermittelt werden. Zum Beispiel konnte Lourbakos in seinen Arbeiten demonstrieren, dass eine Aktivierung des PAR-2 mittels Gingipain R zu einer IL-6-Sekretion in humanen Epithelzellen führte (Lourbakos A et al, 1998, Lourbakos A et al, 2001).

In den Atemwegen der Maus waren PAR-Agonisten in der Lage die Verstärkung einer Leukozytenmigration durch bakterielle Proteasen zu inhibieren (Moffatt JD et al, 2002). Aus diesen Daten könnte



die Hypothese abgeleitet werden, nach der der PAR-2 als Rezeptor für Serin-Proteinasen mit trypsin-ähnlichem Charakter aus Bakterien, Viren oder sogar Pilzorganismen dienen könnte, und auf diesem Weg direkt eine Immunantwort oder einen Entzündungsprozess triggert.

In weiteren Arbeiten konnten Informationen über die Rolle des PAR-2 bei eosinophilen Granulozyten gewonnen werden. Mike et al. zeigten, dass eosinophile Granulozyten funktionstüchtige PAR-2 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Mike S et al, 2001). Die Aktivierung der PAR-2 auf diesen Zellen (sowohl über Trypsin, als auch über das PAR-2-AP) induzierte eine Degranulation und Superoxid-Produktion in eosinophilen Granulozyten. Temkin et al. berichteten, dass die Mastzelltryptase bei eosinophilen Granulozyten die mRNA für IL-8 erhöht und letztlich eine vermehrte IL-8 Freisetzung in diesen Zellen bewirkt (Temkin V et al, 2002). Ein vergleichbarer Effekt der Tryptase bei der IL-8-Expression und Freisetzung konnte ebenfalls beobachtet werden. Dieser Effekt der Tryptase scheint über die Aktivierung des Protein-Kinase/AP-1 – Signaltransduktionsweges vermittelt zu sein. Schmidlin et al. konnten weiterhin demonstrieren, dass die Infiltration mit Eosinophilen und die Hyperreaktivität bei allergischen Entzündungen der Atemwege u.a. auch durch den PAR-2 mit reguliert werden (Schmidlin F et al). Auch die Freisetzung des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktors (GM-CSK) in eosinophilen Granulozyten wird über den PAR-2 gesteuert (Vliagoftis H et al, 2001). All diese Ergebnisse zusammen genommen sind ein deutlicher Beleg dafür, dass der PAR-2 eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der Regulation der eosinophilen Granulozyten und der Modulation der inflammatorisch-allergischen Antwort zu besitzen scheint.

Zahlreiche T-Zelllinien exprimieren ebenfalls den PAR-2 auf ihrer Oberfläche (Hou Let al, 1998). In zwei Zelllinien, die aus T-Zell-Leukämie-Populationen gewonnen wurden (Jurkat und HPB-ALL), konnte durch den Einsatz von Trypsin und des PAR-2-aktivierenden Peptides eine Mobilisierung der intrazellulären Calciumspeicher induziert werden (Mari B et al., 1996).

Die Lokalisation des PAR-1 und PAR-2 auf humanen Mastzellen wurde als erstes von D'Andrea et al. beschrieben. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der PAR-2 sich nicht nur auf der Oberfläche der Mastzellen befand, sondern darüber hinaus auch auf den Membranen der Mastzelltryptase positiven Granula (D'Andrea MR et al, 2000). In welcher Weise eine Stimulation der Mastzellen über den PAR-2 deren Aktivität beeinflusst und mögliche autokrine Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, müssen in der Zukunft noch weiter erforscht werden.

In der Zusammenfassung der o.a. Untersuchungsergebnisse scheinen Serin-Proteinasen vermittelt über PARs einen erheblichen Einfluss auf die Funktion der Immunzellen und des Immunsystems zu haben. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge könnte durchaus hilfreich sein neue antiinflammatorische Medikamente auf der Basis der PARs zu entwickeln.

### **1.1.3.2.3. PAR-2 und Arthritis**

Die Arthritis ist eine chronische Entzündung, die u.a. dadurch charakterisiert ist, dass im Verlauf eine Schwellung der Gelenke auftritt, die von Vasodilatation, Ödemen, Hyperämisierung, Schmerzen und einer Einwanderung von Entzündungszellen (vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen, aber auch Lymphozyten) begleitet wird. In 2003 konnte gezeigt werden, dass der PAR-2 in der Pathophysiologie dieser Erkrankung involviert ist. In diesen Untersuchungen wurden bei PAR-2 defizienten Mäuse künstlich eine Monoarthritis ausgelöst. Die folgende Gelenkschwellung war jedoch weit aus weniger ausgeprägt, als bei Individuen, die den PAR-2 in natürlicher Art und Weise exprimierten (Ferrell WR et al., 2003). Zwei Wochen nach Versuchsbeginn zeigte das Kniegelenk der Wildtyp-Mäuse eine dramatische Veränderung im Sinne einer synovialen Hyperplasie mit begleitender Infiltration von Entzündungszellen und Knorpelzerstörung. 30 Tage nach der Arthritis-Induktion war der Knorpel komplett durch Pannus ersetzt. Im Gegensatz hierzu zeigten die PAR-2-defizienten Mäuse intaktes Knorpelgewebe der betroffenen Gelenkregionen. Dies war ein deutlicher Beleg dafür, dass der PAR-2 Mediator einer proinflammatorischen Antwort in den Gelenken ist.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde ein neues synthetisches aktivierendes Peptid (ASKH95, phenylacetyl-LIGKV-OH) eingesetzt. Die intraartikuläre Injektion provozierte proinflammatorische Effekte, wie z.B. eine synoviale Hyperämisierung und Gelenkschwellung. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass ASKH95 in der Lage ist Symptome der chronischen Inflammation zu induzieren, wie z.B. eine langanhaltende Schwellung, Vasodilatation und Gewebeerstörung. Die zugrunde

liegenden Mechanismen der PAR-2-vermittelten inflammatorischen Effekte in dieser chronisch-entzündlichen Erkrankung sind noch nicht im Einzelnen verstanden. Mögliche Mediatoren könnten z.B. Zytokine und Prostaganoide darstellen. Der PAR-2 scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arthritis zu haben, so dass möglicherweise PAR-2-Antagonisten in Zukunft ein weiterer Behandlungsansatz bei der primär chronischen Polyarthrit sein könnten.

#### **1.1.3.2.4. PAR-2 und das respiratorische System**

Zahlreiche Beobachtungen sprechen dafür, dass der PAR-2 ebenfalls bei Entzündungsprozessen im respiratorischen System eine bedeutende Rolle spielt. Trypsin scheint bei Entzündungen der Atemwege und bei Überempfindlichkeitsreaktionen einen wichtigen, fördernden Einfluss zu haben (Corvera CU et al, 1997). Des Weiteren wird beobachtet, dass nach Exposition von proinflammatorischen Stimuli (Zytokine, etc.) in den Atemwegen ein signifikanter Anstieg der PAR-2-Expression zu verzeichnen ist (Kong W et al, 1997).

Morphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine PAR-2 vermittelte Immunreaktivität im Endothel und in der glatten Muskulatur der Bronchien besteht (Ricciardolo F et al., 2000).

Darüber hinaus ist der PAR-2 auf zahlreichen Zellen des respiratorischen Systems exprimiert (Bronchial-, Tracheal-, Epithel- und glatten Muskelzellen). Dieses Expressionsmuster des PAR-2 könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Rezeptor in der Pathophysiologie der Atemwegserkrankungen (z.B. beim Asthma und der COPD) involviert zu sein scheint. Interessanterweise sind PAR-2-Agonisten dazu in der Lage eine Bronchokonstriktion auszulösen (Schmidlin F et al, 2001). Ob dieser Effekt über die Bildung, bzw. über die Freisetzung anderer Mediatoren funktioniert bleibt derzeit noch unklar. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PAR-2-Agonisten wiederum in den Hauptbronchus eine Relaxierung bewirken können (Cocks TM et al, 1999), so dass Aktivatoren des PAR-2 dosisabhängig wahrscheinlich sowohl eine Relaxation, als auch eine Bronchokonstriktion auslösen können (v.a. bei höherer Dosierung).

Stickstoffmonoxid und Prostaganoide wie z.B. PGE<sub>2</sub> könnten bei diesen Vorgängen beteiligt sein, da eine Potenzierung des bronchokonstriktorischen PAR-2-Effektes durch eine Hemmung der NO-Synthase oder nach Prostanoid-Bildung und COX-2-Aktivierung beobachtet wurde (Lan RS et al, 2001). Letztlich scheint eine PAR-2-Stimulation sowohl kontraktile, als auch dilatatorische Mechanismen im respiratorischen System zu aktivieren. Warum der vorherrschende Effekt in den Atemwegen der Meerschweinchen (in vivo) eine Bronchokonstriktion ist, bleibt derzeit unklar. Ferner konnte Cocks et al. in Bronchienpräparaten aus Ratten einen bronchoprotektiven Effekt nachweisen (Cocks TM et al, 1999). Ähnliche Ergebnisse konnte Ciccia C et al. für das Meerschweinchen-Modell liefern (Cicala C et al, 2001). Andere Untersuchungen wiederum geben Hinweise darauf, dass die PAR-2-Stimulation zu einer Histamin-vermittelten Bronchokonstriktion führen kann (Chambers LS et al, 2001). Die Arbeit von Cocks et al. (siehe oben) zeigte, dass Trypsin mit dem PAR-2 in den Epithelzellen der Atemwege kolokalisiert ist und eine PAR-2-Aktivierung über eine Freisetzung des PGE<sub>2</sub> zu einer Relaxation der Bronchien führt. Prostaganoide scheinen im Rahmen der PAR-2-Aktivierung wichtige Mediatoren nicht nur in der Lunge, sondern auch im Gastrointestinaltrakt zu sein (Lan RS et al, 2000; Kong W, Böhm SK et al., 1997).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Trypsin und andere Trypsin-ähnliche Proteinasen, die in der Nähe von PAR-2-exprimierenden Zellen freigesetzt werden, eine Entzündungsreaktion der Atemwege u.a. mitkatalysieren. Darüber hinaus lässt eine intensive Anfärbung in den apikalen Abschnitten der Epithelzellen des Respirationstraktes für den PAR-2 vermuten, dass möglicherweise auch bakterielle Proteinasen aus dem Lumen Entzündungsreaktionen auf diesem Weg initiieren können (Ubl JJ et al, 2002). Vor einiger Zeit wurde im weiteren beobachtet, dass der PAR-2 die Freisetzung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) stimulieren und auf diesem Weg mit an der Regulation und Reorganisation der extrazellulären Matrix des Lungengewebes beteiligt sein könnte (Vliagoftis H et al, 2000). Als eine wichtige Funktion der MMP-9 wird angenommen, dass durch Abbau der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagenfasern) die Translokation und Migration von Zellen im Rahmen von Entzündungsprozessen ermöglicht wird.

Weiterhin wurde aufgedeckt, dass eine PAR-2-Stimulation der Epithelzellen des Respirationstraktes zu einer Freisetzung der von GM-CSF führt. Dieser Kolonie-stimulierender Faktor vermag u.a. auch

die Proliferation und Vermehrung der eosinophilen Granulozyten anzuregen (Vliagoftis H et al, 2001). Außerdem wurde auch gezeigt, dass über den PAR-2 diverse Interleukin- und PGE<sub>2</sub>-Freisetzungen aus Epithelzellen des Respirationstraktes erfolgen (IL-6 u. IL-8) (Asokanathan N et al, 2002).

Die These, dass der PAR-2 in der Pathophysiologie der allergischen Entzündung der Atemwege eine wichtige Rolle spielt, konnte durch die in 2002 erschienene Arbeit von Schmidlin et al. weiter gestützt werden (Schmidlin F et al, 2002). Um den Effekt des PAR-2 bei allergischen Entzündungen im Respirationstrakt näher zu charakterisieren wurden PAR-2-defiziente und PAR-2-überexprimierende Mäuse untersucht. Hierzu wurden beiden Tiergruppen durch die Injektion von Ovalbumin sensibilisiert und im Anschluss hieran der Grad der Infiltration mit Immunzellen und das Ausmaß der Hyperreaktivität gemessen. Sowohl die Anzahl der eingewanderten eosinophilen Granulozyten, als auch die allgemeine Hyperreaktivität der Atemwege war in der Gruppe der PAR-2 überexprimierenden Tiere deutlich größer als bei den defizienten Mäusen.

Im Gegensatz zu den hier demonstrierten proinflammatorischen Effekten des PAR-2 zeigte die Arbeitsgruppe um Fiorucci S., dass im Colitis-Modell antiinflammatorische Wirkungen über entsprechende Modulatoren vermittelt werden (Fiorucci S et al, 2001). Um die Rolle des PAR-2 bei Entzündungsprozessen und Immunantworten besser zu verstehen sind in der Zukunft natürlich weitere Untersuchungen erforderlich.

#### **1.1.3.2.5. PAR-2 und der Gastrointestinaltrakt**

Kawabata et al. gelang es PAR-2-mRNA in 3 verschiedenen Speicheldrüsen nachzuweisen (Gl. parotis, Gl. sublingualis, Gl. submaxillaris). Unter diesen 3 Speicheldrüsen zeigte die Gl. sublingualis die stärkste Antwort auf eine PAR-2-Stimulation mittels einer Mucin-Sekretion. Diese Reaktion schien durch einen Tyrosinkinase-Signalweg vermittelt zu werden, da Genistein, ein Inhibitor zahlreicher Tyrosinkinasen und anderer Proteinkinasen, den Effekt deutlich abschwächte (Kawabata A et al, 2001).

In einem weiteren Ansatz erfolgte eine Vorbehandlung mit dem Alkaloid Capsicain. Capsicain führt zu einer Aktivierung des transienten Rezeptor-Potenzials von Vanilloid type 1. Vanilloid type 1 wiederum ist bekannt dafür, dass es eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen thermalen Nozizeption spielt. Diese Vorbehandlung mit Capsicain konnte eine Mucinsekretion der Speicheldrüsen nach Stimulation des PAR-2 nicht verhindern. Hingegen konnte die zytoprotektive Schleimproduktion des Magens hierdurch aufgehoben werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass hier sowohl neuroendokrine als auch direkte Mechanismen bei der PAR-2-regulierten exokrinen Sekretion beteiligt sind (Kawabata A et al, 2001). Ein weiteres Indiz dafür, dass der PAR-2 eine wichtige Funktion bei der Regulation der Speicheldrüsensekretion besitzt, konnte durch die In-vitro-Untersuchung gestützt werden, dass PAR-2-Agonisten die Amylase-Sekretion aus der Ohrspeicheldrüse der Ratte bewirken (Kawabata A et al, 2000).

Im Gastrointestinaltrakt ist der PAR-2 darüber hinaus in hohem Ausmaß sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Membran der Enterozyten exprimiert (Kong W, Böhm SK et al., 1997). Weiterhin sind auch Myozyten der muscularis mucosae/ muscularis externa und neuronale Zellen immunoreaktiv für den PAR-2. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Trypsin durch Spaltung und Aktivierung des PAR-2 auf der apikalen Membran von Enterozyten zu einer Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>1a</sub> führt und auf diesem Weg regulatorisch sowohl auf Entzündungsprozesse, als auch zytoprotektiv wirken könnte (s.o., Kong, Böhm et al.).

Auch die Proteinase aus Mastzellen könnte den PAR-2 auf den Enterozyten und Myozyten des Darmes aktivieren und auf diese Weise im Rahmen von Entzündungen eine Mastzellvermittelte Inhibition der Darmmotilität bewirken.

Auch die Vorstellung, dass Trypsin im Pankreas sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen wirken könnte, erscheint auf Grund der hohen PAR-2-Expression im Pankreas sehr plausibel. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es bekanntermaßen zu einer frühzeitigen Aktivierung der Zymogene, so dass Trypsin auch in solchen Zuständen seine Wirkung am PAR-2 entfalten kann (Hoogerwerf WA et al, 2001).

Hoogerf et al. konnten auch beobachten, dass das PAR-2 aktivierende Peptid afferente Neurone im Pankreas aktivieren und sensibilisieren kann, so dass der PAR-2 ebenfalls eine Funktion im Rahmen der Nozizeption in der Bauchspeicheldrüse besitzen könnte. Unterstützt wurde diese These u.a. auch durch die Beobachtung von Hoogerwerf, dass nach Stimulation von Hinterstrangganglien eine Freisetzung des Calcitonin-gene-related-peptides verzeichnet wurde, und dieser Neurotransmitter einen wichtigen Botenstoff bei der Nozizeption darstellt.

Der PAR-2 wird im Pankreas sowohl von den Azinuszellen, als auch von den dukталen Zellen exprimiert. In isolierten Acini konnte durch Gabe von Trypsin und PAR-2-AP eine Amylase-Sekretion provoziert werden (Böhm SK et al, 1996). Weitere in-vivo-Beobachtungen bestätigten die Wirkung des PAR-2 an der Bauchspeicheldrüse, dass über eine Stimulation eine Pankreassaftsekretion ausgelöst werden konnte (Kawabata A et al, 1999).

Interessanterweise führt eine basolaterale Stimulation des PAR-2 auf Monolayern von dukталen Pankreaszellen zu einem Anstieg des Kurzschlussstromes infolge einer Aktivierung kalziumabhängiger Chlorid- und Kaliumkanäle (Nguyen TD et al, 1999). Diese Effekte können dann eine Rolle in vivo spielen, wenn es z.B. im Rahmen einer akuten Pankreatitis zu einer frühzeitigen Freisetzung von Trypsin kommt, und hierdurch die basolateral gelegenen PAR-2-Rezeptoren stimuliert werden.

### **1.1.3.3 PAR-3 und PAR-4 Funktionen**

Wie bereits erwähnt exprimieren Thrombozyten nicht den PAR-1 auf ihrer Oberfläche. Diese Beobachtung, dass Thrombin trotz des Fehlens in der Lage war bei Thrombozyten eine Calciumfreisetzung zu bewirken, führte zur Identifizierung des PAR-3 (Ishihara H et al, 1997).

Beim Menschen wird der PAR-3 in zahlreichen Organen und Gewebetypen exprimiert: Knochenmark, Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Pankreas, Thymus, Dünndarm, Magen, Lymphknoten und in der Trachea, wobei die einzelnen Zelltypen noch identifiziert werden müssen. In Mäusen wird der PAR-3 u.a. auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. Dieser Rezeptor ist für eine normale Thrombinwirkung an den Thrombozyten erforderlich, da eine Blockierung der hirudin-ähnlichen Bindungsdomäne des PAR-3 durch spezifische Antikörper eine regelrechte Aktivierung der Maus-Thrombozyten bei niedrigen (nicht jedoch hohen Dosen) Konzentrationen von Thrombin verhindert wird.

Das gleiche Ergebnis konnte bei PAR-3-defizienten Mäusen beobachtet werden (Kahn ML et al, 1998; Ishihara H et al, 1998). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der PAR-3 einen hochaffinen Thrombinrezeptor in Mäusen darstellt, der durch proteolytische Spaltung aktiviert wird. Interessanterweise führt der PAR-3 bei Ratten hingegen nicht zu einer trombinvermittelten Aktivierung (trotz einer Überexpression), so dass vermutet wird, dass der Rezeptor im Laufe der Evolution bei einigen Spezies seine Funktion verloren hat (Nakanishi-Matsui M et al, 2000).

Wird das PAR-3-Gen in Mäusen ausgeschaltet, führt das zu einem deutlichen Schutz gegenüber der Entstehung von Thrombosen. Im Gegensatz hierzu hat diese Veränderung jedoch vergleichsweise wenig Effekt auf die Hämostase in den betroffenen Tieren (Weiss EJ et al, 2002). Eine Analyse der PAR-3-Expression auf menschlichen Thrombozyten ergab, dass dieser Rezeptor auf den Zellen nicht, bzw. nur sehr gering exprimiert wird (Kahn ML et al, 1999). Dieses Erkenntnis legt den Schluss nahe, dass der PAR-3 im Gegensatz zu dem Gerinnungssystem in Mäusen beim Menschen allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt.

Durch den Einsatz von spezifischen PAR-1- Antikörpern konnte die Aktivierung bei humanen Thrombozyten in niedrigen, nicht jedoch in hohen Thrombinkonzentration, gehemmt werden (Brass LF et al, 1992; Hung DT et al, 1992).

Auf Grund dieser nur unzureichenden Hemmung der Thrombinwirkung wurde davon ausgegangen, dass es noch weitere Thrombinrezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen geben muss. Letztlich führten die Arbeiten zu einem vierten Rezeptortyp, dem PAR-4, der geklont und in der Folgezeit weiter charakterisiert wurde (Xu WF et al, 1998).

Beim Menschen ist auch der PAR-4 weit verbreitet. Die Expression erfolgt in den folgenden Organen: Gehirn, Hoden, Lunge, Skelettmuskulatur, Leber, Pankreas, Schilddrüse und im Dünndarm (Xu WF et al, 1998; Strigrow F et al, 2001).

Sowohl beim Menschen, als auch bei Mäusen werden auf den Thrombozyten zwei Thrombinrezeptoren genutzt. Der PAR-4 zeigt in diesem Zusammenhang jedoch bei beiden Spezies die geringere Thrombinaffinität. Wie oben bereits erwähnt führt erst nur eine sehr hohe Thrombinkonzentration zu einer Plättchenaktivierung. Die PAR-4-Stimulation führt schließlich zu einem Kalziumeinstrom in die Zellen (Andersen H et al, 1999; Loubakos A et al, 2001) zu einer Thromboxan-Produktion und schließlich zur Plättchenaggregation (Henriksen RA et al, 2002; Ma L, Hollenberg, 2001).

Der PAR-4 wird abgesehen von Thrombin auch durch Cathepsin G, einer Proteinase aus den Granula der neutrophilen Granulozyten, aktiviert. Cathepsin G soll die Interaktion von Granulozyten mit Thrombozyten im Rahmen von Gefäßverletzungen und Entzündungsprozessen regulieren. Durch eine Hemmung des humanen PAR-1 kann der Effekt des Cathepsin G auf Plättchen nicht verhindert werden, so dass dieses Ergebnis für eine spezifische Aktivierung des PAR-4 durch Cathepsin G spricht (Sambrano GR et al, 2000). Bei Patienten mit einem Hermansky-Pudlak-Syndrom, einer autosomal rezessiven Erkrankung, fehlen den Thrombozyten bestimmte Granula und zeigen keine adäquate Antwort auf eine Stimulation mit ADP. Trotz allem weisen die erkrankten Menschen nur eine geringe Blutungsneigung auf. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese formuliert, dass der ADP-Aktivierungsdefekt der Thrombozyten durch den PAR-4-Rezeptor kompensiert wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach Freisetzung von ADP der PAR-4 aktiviert werden kann (Covic L et al, 2002). Dieser Umstand könnte bedeuten, dass die ADP-vermittelte Stimulation für eine regelrechte Thrombozytenaggregation nicht zwingenderweise erforderlich ist, solange der PAR-4-Rezeptor ausreichend aktiviert werden kann. In einer anderen Arbeit wurde beobachtet, dass eine PAR-4-induzierte Plättchenaggregation gänzlich ADP-abhängig war (Chung AW et al, 2002). Weiterhin wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass durch eine PAR-1-AP-Konzentration in sehr geringer Dosierung (unterhalb der Schwelle für eine ausreichende PAR-1-Aktivierung) die Effekte einer PAR-4-vermittelten Thrombozytenaggregation potenziert wurden.

Dass der PAR-4 eine wesentliche Funktion im komplexen Vorgang der Hämostase besitzt wurde zusätzlich durch die Untersuchung PAR-4-defizienter Mäuse gezeigt, da diese Tiere eine deutlich gesteigerte Blutungszeit besaßen (Sambrano GR et al, 2001).

Darüber hinaus waren die Thrombozyten dieser Mäuse unfähig ihre Form zu verändern, Kalzium zu mobilisieren und nach einer Stimulation mit Thrombin eine adäquate Aggregationsreaktion zu entwickeln (Ma L. et al, 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben dem PAR-1, der PAR-3 und PAR-4 ein komplexes Regulationssystem in der Hämostase darstellen und z.B. in Zukunft bei der Entwicklung spezifischer Antikoagulantien mit berücksichtigt werden könnten.

Auch im Hinblick auf Thrombin-induzierte inflammatorische Stimuli unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen scheint mittels der PAR-1, -3 und -4-Rezeptoren eine differenzierte Regulation möglich zu sein. In Endothelzellen führt die Stimulation mit Thrombin zu einem schnellen, jedoch vorübergehenden Anstieg der PGI<sub>2</sub>- und PAF (platelet-activating factor)-Sekretion durch die Induktion der Produktion von Zelladhäsionsmolekülen (P-Selectin, E-Selectin) (Sugama Y et al, 1992; Weksler BB et al, 1978).

Thrombin und ein unselektives AP induzieren ebenfalls die Synthese und Freisetzung von Zytokinen aus Endothelzellen (z.B. IL-1, IL-6 und IL-8) (Kaplanski G et al, 1997; Chi L et al, 2001). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass durch Aktivierung des PAR-4 mittels Thrombin die Leukozyteneinwanderung und -Adhäsion an Gefäßwände induziert wird (Vergnolle N et al, 2002).

Obwohl dieser Effekt der Leukozyteneinwanderung und -adhäsion durch Thrombin getriggert wird, konnte durch den Einsatz eines PAR-1-Antagonisten diese Reaktion nicht blockiert werden. Stattdessen war es möglich durch PAR-4-AP die Wirkung auf Leukozyten zu reproduzieren, so dass diese proinflammatorische Reaktion auf die Thrombin-vermittelte Aktivierung des PAR-4 zurückgeführt wird (s. Arbeit oben). Diese Daten vermitteln die Vorstellung, dass der PAR-4 in der Regulation der frühen Phase der entzündlichen Reaktionen beteiligt zu sein scheint.

## 1.2. Regulation des epithelialen Ionentransportes und der epithelialen Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt

Eine der zahlreichen wichtigen Aufgaben im Gastrointestinaltrakt besteht darin, den Elektrolyt- und Wasserhaushalt zu regulieren. Die sezernierte Flüssigkeit dient hier u.a. als Medium für die Verdauungsenzyme und Bestandteile der aufgenommenen Nahrung. Neben dem Magen, Pankreas und der Gallenblase, wird ein nicht unerheblicher Anteil der Flüssigkeit vom Darm produziert. Unter normalen Bedingungen überwiegt in diesem Zusammenhang die Flüssigkeitsreabsorption, so dass ein Großteil der sezernierten Flüssigkeit wieder reabsorbiert wird (Barrett K. E. et al, 2000). Das mengenmäßig wichtigste Elektrolyt ist hier das Chlorid. Bei der Sekretion wird Chlorid parazellulär von Natriumionen begleitet (Ecke D et al, 1996). Der hieraus resultierende Anstieg der intraluminalen NaCl-Konzentration stellt den osmotischen Gradienten für das nachfolgende Wasser dar.

Zur Veranschaulichung der an den Epithelzellen greifenden Prozesse dient die Abbildung 5. Die basolaterale Aufnahme von Chlorid erfolgt über den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter aus dem Blut in die Zelle. Ein alternativer Weg der Chloridaufnahme besteht wahrscheinlich mit dem  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter in Kombination mit dem basolateralen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (Seidler U. et al., 2001). Durch die basolaterale gelegene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wird aktiv gegen ein Gefälle ein  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradient aufgebaut. Hieraus ergibt sich eine Antriebskraft für den Na-Kalium-2Chlorid-Kotransporter (NKCC), weshalb in diesem Zusammenhang man von einem sekundär aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transporter spricht. Darüber hinaus ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase für den Aufbau des negativen Membranpotenzials der Zelle verantwortlich, der eine Triebkraft für die Chloridsekretion darstellt. Wie in der Abbildung erkennbar ist die durch den NKCC-Kotransporter aufgenommene Natriummenge durch das aktive Ausschleusen durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einem gewissen Kreislauf unterworfen. Weiterhin befinden sich in der basolateralen Membran mindestens zwei  $\text{K}^+$ -Kanäle: der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige SK4 und der cAMP-abhängige  $\text{KvLQT1}$ , der sich gut durch Chromanole wie 293 B, in geringerem Ausmaß auch durch Barium hemmen lässt. Die o.g. Kanäle sorgen für ein Recycling der Kaliumionen, verhindern damit eine Zelldepolarisation und sorgen hierdurch für die Aufrechterhaltung der elektrochemischen Triebkraft für die apikal gelegene Chloridsekretion (Bleich M., 2000).

Durch die aktive basolaterale Chloridaufnahme steigt die intrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration und bietet somit das Potenzial für eine bedarfsgerechte apikale Chloridsekretion in das Lumen hinein. Diese intraluminale, apikal gelegene Chloridsekretion wird hauptsächlich durch den cAMP-abhängigen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gesteuert.

Der CFTR wiederum wird in seiner Aktivität vom benachbarten epithelialen Na-Kanal (ENaC) beeinflusst. Eine Aktivierung des einen oder des anderen Kanals führt zu einer umgekehrten Hemmung. Auf diese Weise wird eine potenzielle Natriumüberladung der Zellen vermieden. Durch diesen Mechanismus der apikalen Chloridausscheidung kann die Zelle eine Umkehr des Elektrolyt- und Wassertransportes von Absorption auf Sekretion bewirken (Greger, R. 2000).

Im Kolon zeigt die Exprimierung der verschiedenen Ionentransporter eine Besonderheit auf. Entlang der Krypten-Villi-Axe finden sich unterschiedliche Transportsysteme. Im Bereich der Krypten dominiert die hormonell oder autokrin regulierte cAMP-abhängige Chloridsekretion, wohingegen in den oberflächlichen Zellen durch ENaC eine  $\text{Na}^+$ -Absorption stattfindet (Ecke D. et al, 1996).

Abb.:5

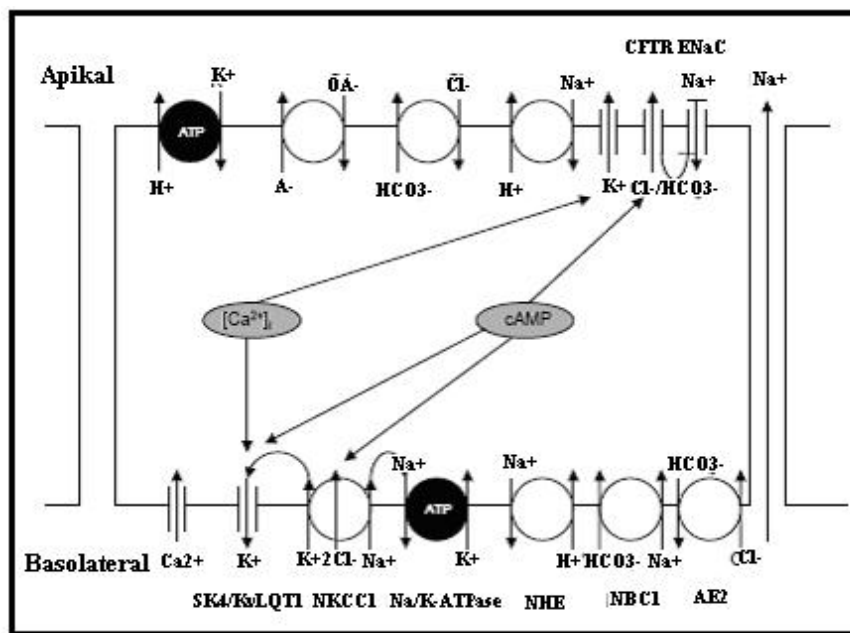


Abb. 5 : Die Transportprozesse im Enterozyten des Kolons (modifiziert nach Greger) (Kong W et al, 1997). Darstellung des Mechanismus der Cl-Sekretion

Die Regulation des epithelialen Transports im Darm und anderen Epithelien erfolgt über vier wesentliche Mechanismen (Barett et al, 2000):

# 1. Regulation über second messenger

Die Funktion der Transporter kann direkt in der Zelle über die Bildung von second messengern gesteuert werden. Bei der Chloridsekretion sind z.B. Ca<sup>2+</sup> und cAMP beteiligt, wobei das zyklische Adenosinmonophosphat den wichtigsten Betrag leistet. Die cAMP-Produktion erfolgt dadurch, dass ein Hormon oder ein geeigneter Botenstoff an einen Gs-gekoppelten Rezeptor bindet und nach Abspaltung der aktivierenden G-Protein-Untereinheit eine membranständige Adenylatzyklase aktiviert (s.o. Greger R, 2000). Durch Phosphorylierung weiterer regulatorische Proteine kommt es in der Folge zu einer Aktivierung z.B. des apikalen CFTR-Kanals und des basolateralen K<sup>+</sup>-Kanals vom KvLQT1-Typ. Hormone, bzw. Transmitter, die über diesen intrazellulären Signaltransduktionsweg eine Chloridsekretion hervorrufen, sind z.B. VIP (Jilling T. et al, 1996), Prostaglandin E2 (Karaki Si. et al, 2004) oder Forskolin (Basavappa S et al, 2005). Wie oben bereits erwähnt stellt auch intrazelluläres Kalzium einen second messenger dar. Der basolaterale gelegene SK4 K<sup>+</sup>-Kanal wird vermutlich über den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration gesteuert (Joiner WJ et al, 1997)

# 2. Kovalente Veränderung der Transporterproteine

Ein weiterer Mechanismus der epithelialen Transportregulation besteht darin, dass die beteiligten Proteine in ihrer Struktur verändert werden. Dies wird z.B. durch Phosphorylierungs-/ bzw. Dephosphorylierungsreaktionen bewerkstelligt. Enzyme, die die Funktion der Phosphorylierung innehaben sind Proteinkinasen, wie z.B. die Proteinkinase A (PKA oder C (PKC). Dem gegenübergestellt sind die Proteinphosphatasen. Als Beispiel für eine Aktivierung eines Chloridkanals durch eine Phosphorylierung sei hier die Stimulation des CFTR-Kanals durch die PKA und PKC genannt (Berger H. A et al, 1993).

3. Steuerung der epithelialen Transportkapazität über die Veränderung der Gesamtzahl der Transportproteine

Als dritter Mechanismus im Zusammenhang mit der Regulation des epithelialen Transportes besteht die Möglichkeit die Aktivität der Transporter durch die Veränderung der Gesamtzahl zu beeinflussen. Dies geschieht durch den Einbau, bzw. Ausbau von Transportern in die Membran. Hier kann die Zelle auf einen gewissen Vorrat von vorgefertigten, in Membranvesikel gespeicherten Transportern zurückgreifen und bei Bedarf und spezifischem Stimulationsreiz eine Fusion der Vesikel mit der Membran zu initiieren. Umgekehrt kann natürlich durch Endozytose die Gesamtzahl der Transporter wieder verringert werden. Diese Form der Transporterregulation konnte sowohl für NKCC1 als auch für CFTR gezeigt werden (Reynolds et al, 2007).

4. Regulation auf der Ebene der Genexpression für Transporterproteine durch Veränderung der Transkriptions-/Translationsrate

Im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Mechanismen der Regulation ist diese Form durch eine sehr viel langsamere Kinetik charakterisiert. Durch entsprechende Reize wird die Zelle veranlasst, über eine Erhöhung der Transkriptions- und Translationsrate die Proteinneusynthese in Gang zu setzen.

### **1.3. Hypothese zur der Funktion des PAR-2 bezüglich der Ionensekretion und epithelialen Permeabilität im Gastrointestinaltrakt**

Wie im vorangehenden Kapitel bereits angedeutet wurde, besitzen intestinale Epithelzellen eine Vielzahl von Mechanismen, um die Elektrolyt- und Wassersekretion aktiv zu steuern. Die Fähigkeit des Epithels rasch die sekretorische Rate anzuheben dient zum einen dazu den Chymus mit den sezernierten Verdauungsenzymen ausreichend zu vermischen und zum anderen im Falle einer intraluminalen Schädigung des Organismus durch pathogene Keime und toxische Metabolite den Darm freizuspülen (E. Cario, 2002).

In zurückliegenden Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung des PAR-2 zur Freisetzung von Prostaglandinen führt (Böhm SK et al, 1996).

Wie bereits o.a. vermag eine Prostaglandinsekretion über weitere intrazelluläre Signalkaskaden den apikal gelegenen CFTR-Kanal zu aktivieren (Karaki Si. et al, 2004) und letztlich hierüber eine Chloridsekretion auszulösen. Passiv kommt es im Rahmen einer intraluminalen Chloridsekretion zu einer Wassersekretion in den Darm, so dass die Aktivierung des PAR-2 mit konsekutiver Chlorid- und Wassersekretion zum einen als protektive Spülfunktion im Darm, und zum anderen, als wichtiger Zwischenschritt bei der Vermischung des Chymus mit den Verdauungsenzymen angesehen werden kann.

In dem Kapitel über den Einfluss des PAR-2 auf das Immunsystem wurde auf zahlreiche Arbeiten eingegangen, in denen u.a. gezeigt werden konnte, dass auch bakterielle Enzyme dazu in der Lage sind PAR-Rezeptoren zu aktivieren. Eine Chlorid- und Wassersekretion könnte wie erwähnt einen wichtigen Schutzmechanismus darstellen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass direkt über den PAR-2-Rezeptor ein Einfluss auf den transepithelialen Widerstand geübt wird, bzw. dass als adaptiver Vorgang nach unmittelbarem Kontakt zu pathogenen Keimen die Interzellularspalten verstärkt werden. Diese beiden hypothetischen Funktionen speziell des PAR-2-Rezeptors sollen im Rahmen dieser Arbeit weiter erörtert werden.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Grundlagen

Gegenstand der durchgeführten Versuchsreihen war es den Einfluss des physiologischen PAR-2 Agonisten (Trypsin) und des synthetisch hergestellten aktivierenden Peptides auf die epitheliale Barriere und Ionensekretion beispielhaft an zwei menschlichen immortalisierten Zelllinien zu untersuchen. Für die Zelllinien HT 29 CL.16E und T84 war in vorangegangenen Arbeiten sowohl die Expression des erforderlichen Rezeptortyps (PAR-2), als auch eine Chloridsekretion nachgewiesen worden (X. Guo et al, 1995; Barrett KE et al, 1993).

Darüber hinaus wurden zur weiteren Charakterisierung der ablaufenden physiologischen Prozesse die Wirkung von Carbachol und Prostaglandin E<sub>2</sub> untersucht.

Hierzu wurden die beiden Zelllinien nach Ausdifferenzierung in die modifizierte Ussing-Kammer (Ussing und Zerahn, 1951) eingebracht und Kurzschlussstromexperimente nach Ermittlung und Korrektur des Badwiderstandes durchgeführt. Hierbei wurden schließlich der vom Epithel erzeugte elektrische Strom ( $I_{sc}$ ), der transepitheliale Widerstand (TER), als auch die elektrische Spannung (PD) gemessen.

### Charakterisierung der Zellen

#### T 84-Zelllinie

Die T84-Zelllinie ist aus einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinoms bei einem 72-jährigen Mann gewonnen.

Zunächst wurden Tumorzellen in thymuslosen Nacktmäusen subkutan inokuliert und in den folgenden Passagen weiter kultiviert. Hierbei wurden die ursprünglichen feingeweblichen Merkmale der Kolonkarzinomzelllinie durchgehend erhalten (Murakami H et al, 1980).

Nach 23 Passagen konnte auf diesem Weg die T84-Zelllinie etabliert werden. In den folgenden Untersuchungen konnte für diese Zellen ein konfluierendes Wachstum gezeigt werden. Interzelluläre Bindungen werden hierbei durch tight junctions und Desmosomen gewährleistet (Dharmasathaphorn K, et al, 1984).

In der oben genannten Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Zellen neben zahlreichen Rezeptoren für Neurotransmitter und Peptidhormone, auch über vektorielle Transportmechanismen für Elektrolyte verfügen.

#### HT 29 CL.16E

Die ursprüngliche HT-29-Zelllinie wurde 1964 ebenfalls aus einem Adenokarzinom des Kolons gewonnen (Fogh J et al, 1975).

Der Primärtumor mit guter Differenzierung (Grad 1) wurde aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Patientin isoliert. Die Zelllinie wächst als nichtpolarisiertes Monolayer und zeigt in vitro, ohne Modifikation des Kulturmediums, im Vergleich mit normalen Kolonzellen weniger gut erhaltene Differenzierungscharakteristika. In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass unter Veränderung der Kulturbedingungen oder durch die Hinzugabe von speziellen chemischen Stoffen eine Differenzierung induziert werden konnte. Hierzu gehört unter anderem die Ausbildung von tight junctions, die vergleichbar mit den physiologischen Bedingungen in der Colonschleimhaut, eine apikale und basolaterale Differenzierung der Zellen ermöglicht (BS Mitchell et al, 1997; Fitzgerald M. et al, 1997).

Eine abgeleitete Zelllinie stellt die HT 29 CL.16 E-Linie dar. Chantal Augeron und Christian L. Laboisse konnten im Jahre 1984 durch eine Behandlung der HT-29-Linie mit Natriumbutyrate eine stabile Differenzierung der Zellen induzieren. Diese Zellen waren nun imstande feste Interzellularbrücken auszubilden (tight junctions) und u.a. Mucus im Bereich der apikalen Membranseite zu

produzieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese differenzierte Zelllinie zahlreiche Rezeptoren für verschieden Liganden besaß, wodurch verschiedene Prozesse, wie z.B. auch der Elektrolyttransport beeinflusst werden konnten (C. Augeron and C. L. Labois, 1984).

## 2.2. Materialien

### 2.2.1. Geräte

Folgende Geräte wurden im Verlauf der Arbeit genutzt:

Geräte	Firma
Cleanbench Heraeus Laminair	Heraeus
Brutschränke Function Line	Heraeus
Destillationsanlage	Millipore GmbH (Eschborn)
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Optima XL-100K	Beckmann (Unterschleißheim/Lohhof)
Ussing-Kammer Fa. Fiebig (Berlin) modifiziert für den Einsatz von Millicell Inserts	
Wasserbad Thermomix 1420	Fa. Braun Melsungen
Volt/Ohm-Meter EVOMX	World Precision Instr. (Sarasota/USA)
Heim-PC mit Analogon-Software	IBM
Voltage Clamp Messstand CVC6	Fa. Fiebig (Berlin)
Attofluor Messkammer	Molecular Probes (Leiden, NL)
Till-Photonics Photometer	Fa. Gräfeling
Nikon Inversionsmikroskop	Nikon, TE 2000 (Düsseldorf)

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Combitips plus (für Multipipette Plus)	Eppendorf (Hamburg)
Kanülen	Lehnecke (Schortens)
Kryoröhrchen Bibby	Sterilin (Staffordshire/UK)
Pipettenspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen	Lehnecke (Schortens)
Inserts	Millipore GmbH (Eschborn)
BD Falcon Zellkulturflaschen	BD Biosciences (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen	Zefa Labortechnik (Harthausen)
Argenthal-Standardelektroden	Ingold, Steinbach
Doppelwandige Glasbehälter	Glastechnische Werkstätten des Fach-Bereichs Chemie (Philipps-Uni.-Marburg)
Plexiglas-Meßkammern	Feinmechanische Werkstatt, Klinikum der Philipps-Universität Marburg
24-Loch-Kulturplatten	Millipore GmbH (Eschborn)
Coverslips	Nunc GmbH&Co.KG (Wiesbaden)

### 2.2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Medien und Zusätze	Firma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
DMEM/HAMs F12	Sigma-Aldrich Chemie
FBS (Fetales Bovines Serum)	Sigma-Aldrich Chemie
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie

### 2.2.4 Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Phosphate Buffered Saline System PBS1	Sigma-Aldrich Chemie
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie
Aktiviertes Peptid (SLIGRL-NH <sub>2</sub> )	University of Calgary, Canada
Reverses Peptid (LRGILS-NH <sub>2</sub> )	University of Calgary, Canada
Prostaglandin E2	Cayman Chemical (AnnArbor, MI, USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie
Trypsinhibitor Typ I-S, aus Sojabohnen	Sigma-Aldrich Chemie
TNF $\alpha$	Sigma-Aldrich Chemie
Carbachol (Carbamylcholin Chlorid)	Sigma-Aldrich Chemie
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie
Fura-2-AM	Molecular Probes (Leiden, NL)
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie

MgCl	Sigma-Aldrich Chemie
KCl	Sigma-Aldrich Chemie
Dextrose	Sigma-Aldrich Chemie
Pluronic F-127	Molecular Probes (Leiden, NL)
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie

#### 2.2.4 Zellen

Zellen	Herkunft
T84	ATCC, American Type Culture Collection, Washington, USA ([225])
HT 29 Cl.16 E	Groupe de Research de la digestiv ; <u>Maoret JJ</u> et al. Nantes, Frankreich

#### 2.2.5 Lösungen und Medien

##### Erhaltungsmedium DMEM zur Kultivierung der Zelllinie HT 29 Cl.16E:

4 mM L-Glutamine	1%
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)	1%
Fetales Rinderserum hitzeinaktiviert	10%
DMEM (mit 4500 mg Glukose/l, HCl, NaHCO <sub>3</sub> )	88%

##### Erhaltungsmedium DMEM / HAMs F12 zur Kultivierung der Zelllinie T84:

2,5 mM L-Glutamine	1%
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)	1%
Fetales Rinderserum	5%
DMEM/HAMs F12 (mit 4500 mg Glukose/l, HCl, NaHCO <sub>3</sub> )	93%

##### Medium zur Kryokonservierung der Zellen:

DMSO	10%
Kulturmedium	90%

#### Versuchslösung für Messungen an der Ussing-Kammer (Ussing und Zerhan, 1951):

Zusammensetzung (Werte in mmol/l):

Na <sup>+</sup>	140,0	Cl <sup>-</sup>	123,8
K <sup>+</sup>	5,4	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,4
Ca <sup>2+</sup>	1,2	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,6
Mg <sup>2+</sup>	1,2	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21,0

D(+)-Glucose	10,0	D(+)-Mannose	10,0
L-Glutamin	2,5	DL-β-H-Butyrat	2,5

**Versuchslösung für Messungen am Calcium-Photometer (HanksBSS/BSA-Solution, Stock):**

Stocklösung:

NaCl	8,0 g/l	HanksBSS	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,09 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g/l
Phenolrot	0,01 g/l		
KCl	0,4 g/l		
D-(+)-Glucose	1,0 g/l		
pH	7,4		

**Versuchslösung für Messungen am Calcium-Photometer (HanksBSS/BSA-Solution):**

Stocklösung (s.o.)	50 ml	MgCl <sub>2</sub>	1 M
Aquadest	350 ml	pH	7,4
BSA	1 mg/ml	Temperatur	37°C
NaHCO <sub>3</sub>	455 mM		
MgSO <sub>4</sub>	1 M		
CaCl <sub>2</sub>	1 M		

Abschließend bis zu einem Volumen von 500 ml mit Aquadest auffüllen.

**Kalibrierungslösung für Calciumphotometrie:**

Für maximale Calciumkomplexierung (=R<sub>max</sub>)

NaCl 10,0 mM	KCl 130,0 mM	MgSO <sub>4</sub> 1,0 mM	HEPES 25,0 mM
Ionomycin 5 µM	KCN 1mM	N 10 mg/ml	CaCl <sub>2</sub> 3 mM
pH 6,5	37°C		

Für minimale Calciumkomplexierung (=R<sub>min</sub>)

EGTA 5 mM	pH 6,5	37°C	
-----------	--------	------	--

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden stets an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 ausgeführt. Um sterile Bedingungen zu schaffen und Kontamination zu verhindern wurden Tätigkeiten mit den Zellen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Alle mit humanem Zellmaterial in Kontakt getretene Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 70%igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die HT 29 CL.16E – und T84- Zelllinien wurden zunächst in Falcon Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Der Austausch des Kulturmediums erfolgte alle 2 Tage. Nach ca. 10 bis 14 Tagen zeigte der Zellverband einen konfluenten Zellrasen. Für sämtliche Experimente wurden Passagenummern von 18 bis 45 für CL.16 E; bzw. 13 bis 29 für T 84 verwandt.

Zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen an der Ussing-Kammer wurden die Zellen nach 10-tägiger Kultivierung auf spezielle Einsätze mit poröser Membran ausgesät (= Inserts von Millicell-CM, Millipore GmbH, Eschborn, Katalog-Nr.: PIHA01250 , siehe Abb. 6 und 7). Diese Zelleinsätze besitzen Poren mit einem Durchmesser von 0,5 µm. Im Gegensatz zu einer undurchlässigen Kunststoffoberfläche bieten diese aus Polytetrafluorethylen bestehenden Membranen, den Vorteil, dass auf Grund der Permeabilität sowohl die apikale, als auch die basolaterale Membran mit der Extrazellulärmatrix in Kontakt treten kann. Diese Eigenschaft begünstigt eine noch bessere Differenzierung der kultivierten Zellen. Auch im Hinblick auf die Versuchsreihe, bei der das Verhalten der Zellen sowohl nach apikaler, als auch nach basolateraler Stimulation untersucht werden soll, bieten diese Zelleinsätze ideale Voraussetzungen.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,8-1,2 \times 10^6$  pro Insert (0,6cm<sup>2</sup>/Insert) ausgesät und in 24-Lochkulturplatten weiter aufgezogen. In den folgenden 7-10 Tagen wurde das Kulturmedium aus dem apikalen und basolateralen Kompartiment täglich gewechselt und die Entwicklung des transepithelialen Widerstandes (TER) mit dem Volt/Ohm-Meter verfolgt (Abb. 8, siehe Entwicklung des TER im Ergebnisteil).

Nach Erreichen des Plateaus des maximalen transepithelialen Widerstandes wurden die Zellen zur Durchführung der Messung in die Ussing-Kammer eingebracht.

Abb. 6



Kulturplatteneinsatz  
(Ø 12 mm; Porengröße 0,45 µm)

Abb.7



24-Lochkulturplatte mit Einsätzen  
bestückt

Abb. 8



Messung mit Volt/Ohm-Meter

### 2.3.2 Subkultivierung und Aussaat in die Kulturplatteneinsätze

#### Subkultivierung

Eine Subkultivierung der Zellen wurde nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens durchgeführt (ca. nach 10-14 Tagen). Das Aufteilungsverhältnis in Tochtergenerationen lag je nach Zelllinie bei 1:3 (HT 29 Cl.16 E) bis 1:4 (T84).

Zur Splittung der humanen Kolonkarzinomzellen (sowohl für T84, als auch für HT 29 Cl.16 E gleiches Verfahren) wurden die Zellen einmal mit 100 µl PBS pro cm<sup>2</sup> gereinigt, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit einigen Tropfen Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und für max. 3 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Kulturschale konnten die Zellen vom Kulturschalengrund gelöst werden. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von wenigen Millilitern Kulturmedium beendet, die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in frische Kulturschalen ausgesät bzw. für die Zellzählung verwendet.

#### Bestimmung der Zellzahl und Aussaat in die Einsätze

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung (s. Abschnitt oben) von der Kulturschale abgelöst, in Kulturmedium gewaschen und eine Zentrifugation mit 200 x g durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und 1 Tropfen dieser Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

Wenn das spezielle Deckglas auf die Kammer gelegt wird, entsteht zwischen den Netzquadraten und dem Deckglas ein Abstand von 0,1 mm, so dass sich über jedem Großquadrat ein Volumen von  $(0,0025 \times 0,0025 \times 0,1 = 6,25 \times 10^{-7})$  mm<sup>3</sup> befindet. Unter dem Mikroskop werden je 8 Großquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Schließlich wird mit u.a. Formel die Zellzahl pro ml Suspension ermittelt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Mittelwert} \times 10^7}{2,5 \text{ ml}} = \text{Zellen/ 1 ml}$$

So wurde nach Bestimmung der Zelldichte in der Suspension die erforderliche Menge an Zellen pro Insert ausgesät ( $0,8-1,2 \times 10^6$ ).

### **2.3.4 Kryokonservierung und Auftauen**

#### **Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie zum Splitten bzw. Aussäen vom Boden der Kulturschale befreit. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei  $200 \times g$  wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit Medium (Kulturmedium mit 10 %DMSO) zur Kryokonservierung resuspendiert und in 1 ml Aliquoten in Kryoröhrchen verteilt ( $2-3 \times 10^5$  Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer isolierenden Styroporbox im Gefrierschrank langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  heruntergekühlt, um Schäden an den Zellen durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu verhindern. Nach ca. 2-4 Tagen wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) umgelagert.

#### **Auftauen von Zellen**

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff sofort in ein körperwarmes Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) gegeben und aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium langsam überführt und 5 min bei  $200 \times g$  sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit dem entsprechenden Kulturmedium in Lösung gebracht und in Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt.

### **2.3.5 Ussing-Kammer**

Nachdem die Zellen in die Kulturplatteneinsätze ausgesät worden sind und sich nach weiteren 10 Tagen ein konfluentes Monolayer mit einem entsprechend hohen transepithelialen Widerstand ausbilden konnte, wurden die Inserts in die Ussing-Kammer eingebracht.

In der Ussingkammer soll der Ionentransport in einem intakten flächigen Epithel untersucht werden. Dabei können Ladungsverschiebungen gemessen werden, die von einer Seite des Epithels auf die andere Seite transportiert werden. Der zu messende Strom ist ein Summenstrom aller Ladungsverschiebungen über das Epithel, wobei sich Anionen- und Kationenströme überlagern. Zur Identifizierung und genaueren Untersuchung eines spezifischen Ionenstroms können z.B. Blocker eingesetzt werden, die spezifisch bestimmte Kanäle hemmen.



Abb.9:

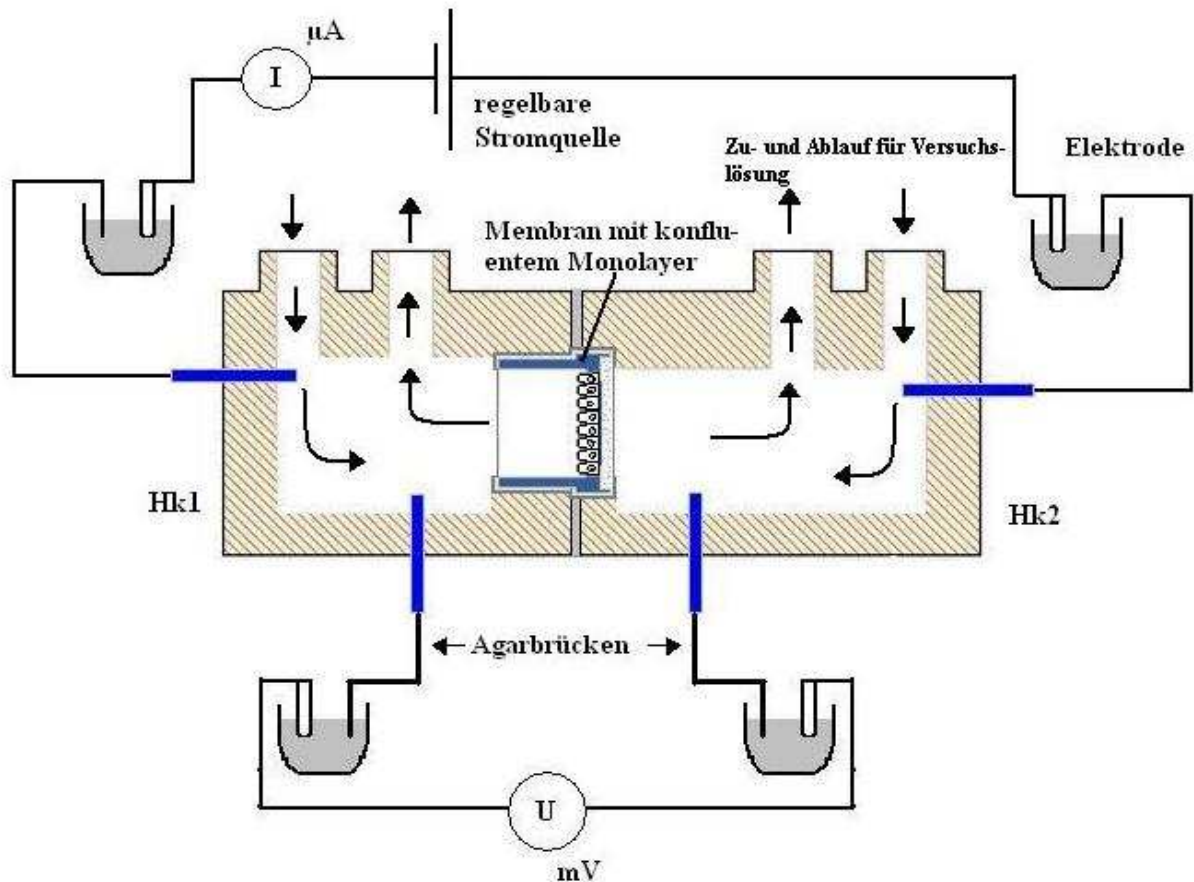


Abb.9: Messkammer mit elektrischen Verbindungen; Fläche des konfluenten einschichtigen Zellrasens ca.  $0,6 \text{ cm}^2$ . Hk1= Halbkammer mit apikalem Kompartiment; Hk2= Halbkammer mit basolateralem Kompartiment; Ag/AgCl-Elektroden in Elektrodenöpfchen; U = Voltmeter, I = Amperemeter (Eigene Abbildung)

In der Abb. 9 findet sich die fertig zusammengesetzte Versuchsanordnung aus 2 Halbkammern mit den Zu- und Abläufen für das Kulturmedium, sowie die Agar-Elektroden. Bei den verwendeten Halbkammern handelte es sich um innen konisch geschliffene Plexiglaszylinder ( $\varnothing 10 \text{ mm}$ ). Ein Zylinder (= Halbkammer 1) besitzt die Möglichkeit einen Zellkulturplatten-Einsatz aufzunehmen und ist mit einem Nadelkranz bestückt, so dass der passende zweite Hohlzylinder mit den dazu korrespondierenden Bohrungen (= Halbkammer 2) aufgesetzt werden kann und hierdurch eine geschlossene Messkammer mit getrennten Zu- und Abläufen sowie elektrischen Verbindungen pro Halbkammer entsteht. Die Epithelfläche pro Insert betrug  $0,6 \text{ cm}^2$ . Für alle Experimente wurde eine Lösung nach Schulzke et al. (Schulzke et al, 1986) benutzt, die in dem doppelwandigen Glasbehälter durch ein ans Wasserbad angeschlossenes Kreislaufsystem dauerhaft bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten wurde.

In die Versuchslösung wurde während der gesamten Versuchsdauer über den aufsteigenden Schenkel Carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) insuffliert. Die kontinuierliche Carbogenzufuhr bewirkte zum einen eine permanente Zirkulation der Versuchslösung und gewährte darüber hinaus eine ausreichende  $\text{O}_2$ -Versorgung des Epithels sowie eine Stabilisierung des pH.

## Prinzip der Voltage Clamp (Spannungsklemme)

Aktiver Ionentransport führt zu einem elektrischen Stromfluss durch das Epithel. Dabei wird eine elektrische Spannung (transepitheliale Potenzialdifferenz) über dem Epithel erzeugt. Möchte man diese Ionenströme, bzw. Potenzialdifferenzschwankungen erfassen, ist es notwendig alle Einflüsse passiver Transportprozesse, d.h. alle elektrochemischen Gradienten auf nahezu Null herunterzufahren. Bei Nichtgeladenen Substanzen gelingt dies, indem zu beiden Seiten des Epithels gleich große Konzentrationen, Temperaturen und Druckverhältnisse eingestellt werden.

Unter physiologischen Verhältnissen kommt es jedoch zusätzlich zu einem elektrischen Transport der gelösten Ionen. Deshalb ist es vor der Messung erforderlich eine durch passive Ionentransportprozesse erzeugte transepitheliale elektrische Spannung auf Null zu bringen, so dass der dann vorhandene Nettotransport alleine dem vom Epithel angetriebenen, aktiven Transport entspricht.

Zur beliebigen Änderung und Einstellung der Spannungsgröße (also auch auf 0 mV) über dem Epithel wird die Spannungsklemme (Voltage Clamp) eingesetzt.

Durch Einsatz einer Stromquelle wird dabei gerade soviel Strom durch das Epithel geschickt, bis man den gewünschten Wert der Potenzialdifferenz erhält.

Wird nun mit der Spannungsklemme über dem Epithel auf 0 mV geklemmt, so entspricht der im Klemmstromkreis fließende Kurzschlussstrom (short circuit current,  $I_{sc}$ ) dem aktiven Netto-Ladungstransport des Epithels (Ussing und Zerahn, 1951).

## Messung von Spannung, Kurzschlussstrom und transepitheliale Widerstand

Bei den durchgeführten Versuchen wurden stets Messungen an 6 Inserts ( $n=6$ ) gleichzeitig vorgenommen. Vor dem Einspannen der Inserts wurde eine Messung der Elektrodenasymmetrie in der Versuchsanordnung (offset) durchgeführt. Technische Probleme wie Luftblasen in zu- und abführenden Schenkeln des Schlauchsystems, unsichere Kabelverbindungen oder Unterbrechungen der stromleitenden Agar-Agar-Brücken können auf diesem Wege durch auffällig große Fehlerströme und Fehlerspannungen erkannt und anschließend behoben werden.

Im nächsten Schritt wurde der Widerstand der Badlösung (=Versuchslösung) bestimmt. Dieser betrug im Durchschnitt 21  $\Omega$  und war damit im Vergleich zum Epithelwiderstand eher gering. Über Argenthal®-Standardelektroden und einem daran angeschlossenen 6-fach Voltage-Clamp-Meßstand (CVC 6) wurde die transepitheliale Potenzialdifferenz regelmäßig gemessen. Das eine Ende der Elektroden befand sich in Plastikzylindern, welche als Bezugs elektrolyt gesättigte Kaliumchloridlösung (3 M) enthielten. Zur elektrischen Verbindung mit der Messkammer wurden Polyethylenbrücken benutzt, die eine Füllung aus in 1,8%iger NaCl-Lösung erstarrtem Agar-Agar (30 g/l) enthielten.

Als Bezugspunkt der Spannungsmessung wurde die apikale Epithelseite festgelegt. Die erhaltenen Werte stellen also die Spannung der apikalen gegen die basolateralen Seite des Epithels dar ( $V^{ap}/V^{bl}$ ).

Für die Bestimmung des transepithelialen Widerstandes (TER) wurde bei jeder Messung (um 200 ms zeitverzögert) je ein bidirektionaler Strompuls von 50  $\mu A$  über Ag/AgCl-Elektroden appliziert, die sich daraufhin ergebende Potenzialänderung erfasst und TER aus beiden Parametern unter Berücksichtigung von exponierter Epithelfläche (hier 0,6  $cm^2$ ) und Widerstand der Versuchslösung automatisch errechnet:

$$TER = \left( \frac{\Delta V_{KL}}{I_{KL}} - R^{Bad} \right) * A^{epi}$$

Wobei	TER	transepithelialer Widerstand ( $\Omega * cm^2$ )
	$I_{KL}$	applizierter Klemmstrom ( $\mu A$ )
	$\Delta V_{KL}$	Potenzialänderung (Spannungsantwort, mV)
	$R^{Bad}$	Badwiderstand ( $\Omega$ )

$A^{\text{epi}}$  exponierte Fläche in der Kammer ( $\text{cm}^2$ ) ist.

Nach dem Ohmschen Gesetz wird schließlich der Kurzschlussstrom ( $I_{\text{sc}}$ ) aus transepithelialer Potenzialdifferenz ( $V^{\text{ap}}/V^{\text{bl}}$ ) und dem Widerstand (TER) berechnet:

Wobei 
$$I_{\text{sc}} = \frac{V^{\text{ap/bl}}}{\text{TER}}$$
 ist.

Mit dem Voltage-Clamp-Meßstand und der dazugehörigen Software (ANALOGON Steuerprogramm) können die Registrierintervalle stufenlos reguliert werden. So kann man bei einer Erfassung der Daten im 5-Sekunden-Takt sogar kurzzeitige und rasch einsetzende Effekte einer Substanz registrieren. Die erhaltenen Daten für Kurzschlussstrom, transepithelialen Potenzialdifferenz und Widerstand wurden auf einem normalen IBM-kompatiblen PC gespeichert und mittels eines weiteren Programms (ANALOGA Ausgabemodul) in ein exportfähiges Format gebracht. In Abb.10 findet sich eine schematische Darstellung der Ussing-Kammer mit eingebrachtem Insert und die durch den „bubble lift“ im Kreislauf gehaltene Badlösung.

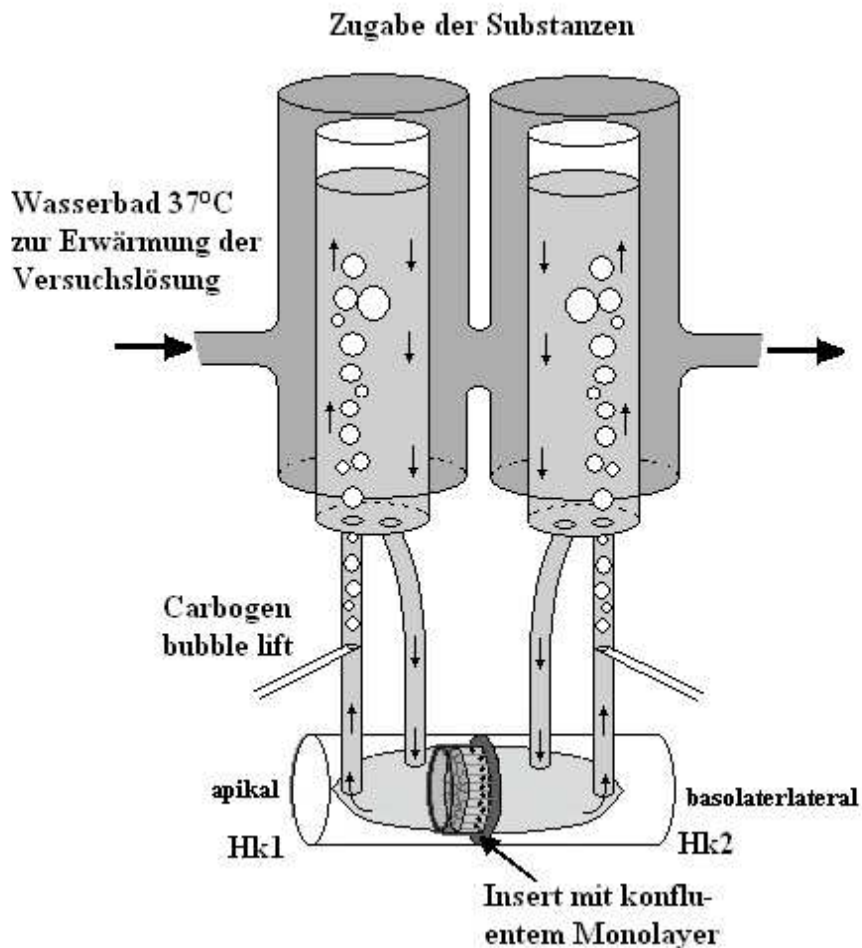


Abb. 10: Schematische Darstellung der Ussing-Kammer mit Insert und Zu-/Ablauf der Versuchslösung; Volumen apikal und basolateral je 10 ml (hellgraue Farbe). Zirkulation der Versuchslösung mit den zugeführten Substanzen wird durch die Carbogeninsufflation in den aufsteigenden Ablaufschlenkel (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, „bubble lift“) bewerkstelligt; elektrische Verbindungen nicht dargestellt.  
(Eigene Abbildung)

### 2.3.6 Calcium-Photometrie

Die Aktivierung einer großen Anzahl von Membranrezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, entweder als Folge eines Einstromes aus dem Extrazellularraum oder auf Grund der Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Calcium kann bei diesen Vorgängen entweder als Second messenger in der Kette der Signaltransduktion fungieren oder erst später freigesetzt werden.

Um festzustellen, ob im Rahmen der rezeptorvermittelten Aktivierung und intrazellulären Signaltransduktion bei den hier verwendeten Zelllinien (T84 und HT 29 CL.16E) Calcium ebenfalls involviert ist, wurde nach Stimulation mit den entsprechenden Agonisten (Trypsin und PAR-2-AP) die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration photometrisch bestimmt.

Zur genauen Bestimmung der Calciumkonzentration stehen mittlerweile hochspezifische Calciumindikatoren zur Verfügung. In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (siehe Abb. 11) verwendet, der eine sehr hohe Calciumbindungsaffinität besitzt.

Entsprechend den Arbeiten von Grzegorz Gryniewicz et al. aus dem Jahre 1985 (Gryniewicz G et al, 1985) wurde die Calcium-Indikatoreigenschaft der o.a. Substanz als optisches Nachweissystem genutzt.

Hierbei wird die calciumkomplexierte Form von Fura-2 AM mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 340nm angeregt und die nachfolgende Emissionsintensität bei 540nm bestimmt. Freies, nichtgebundenes Fura-2 AM hingegen emittiert bei einer Bestrahlung von 380nm. Aus dem Verhältnis der Emissionsintensitäten bei 340nm/ 380nm kann schließlich nach Anwendung des Massenwirkungsgesetzes die aktuelle intrazelluläre Calciumkonzentration bestimmt werden. Je nach Angebot von freiem Calcium liegt ein Gleichgewicht zwischen dem freien Farbstoff und seinem Calciumkomplex, der sein Absorptionsmaximum im kurzwelligeren UV-Licht Bereich hat. Die Exzitationswellenlängen von 380nm (freies Fura-2) und 340nm (für den Calciumkomplex) sind an Hand des Exzitationsspektrums (vgl. Abb. 12) optimiert.

Durch Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen lässt sich  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig von der Farbstoffkonzentration bestimmen. Damit werden Messfehler durch Ausbleichen des Farbstoffes oder Konzentrationsschwankungen nahezu komplett eliminiert. Die Ergebnisse sind damit auch unabhängig von der absoluten Empfindlichkeit des Messgerätes. Hierdurch ist dieses Messsystem bezüglich der Genauigkeit anderen Methoden überlegen.

#### Kalibrierung

Vor Beginn der Messung wurde das Gerät mit den o.a. Lösungen kalibriert.

Hierzu wurde im ersten Ansatz  $CaCl_2$  und Ionomycin zu den Zellen hinzugegeben. Ionomycin ist ein Calciumionophor und vermittelt durch die Ausbildung calciumselektiver Poren den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum und den intrazellulären Speichern in das Cytosol. Durch den Ausgleich des physiologischen Konzentrationsgradienten wurde die maximale Calciumkonzentration in den Zellen eingestellt. Hierdurch wurde der Anteil an freiem Fura-2 AM vollständig komplexiert und die maximale Ratio ( $R_{max}$ ) gemessen.

Im zweiten Ansatz wurden die Zellen mit 5mM EGTA behandelt. EGTA ist ein Calciumchelator, so dass bei Zugabe die zytosolische Calciumkonzentration gegen null geht und somit der Anteil an freiem, unkomplexiertem Fura-2 AM den größtmöglichen Wert erreicht (Bestimmung der minimalen Ratio ( $R_{min}$ )).

Nach Anwendung des Massenwirkungsgesetzes erhält man schließlich die

Standardgleichung zur Kalibrierung:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

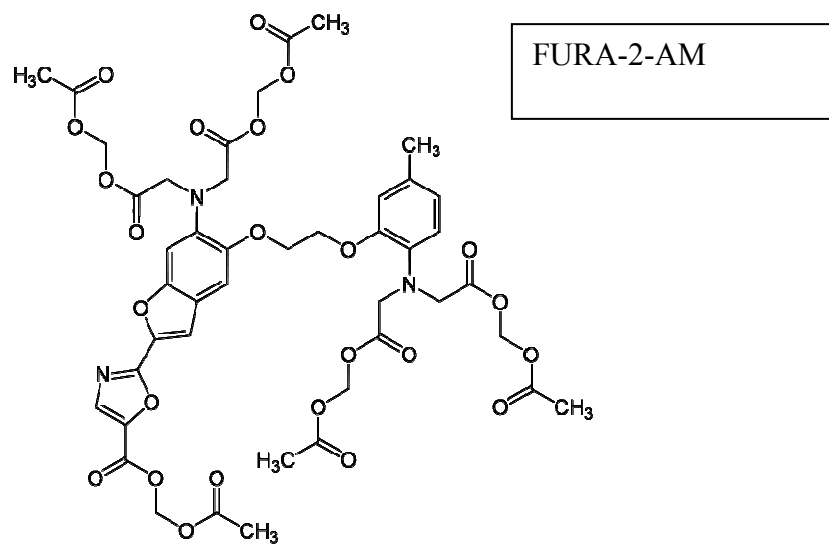
Wobei  $R$  = korrigiertes Hintergrundsignal

$K_d$  = Dissoziationskonstante, unter den gegebenen Bedingungen  
224 nm (Maß für die Bindungsaffinität von Fura2-AM  
für  $Ca^{2+}$ )

Rmin = Fluoreszenzratio 340 nm/ 380 nm bei Ca-Konzentration  
nahe Null

Rmax = Fluoreszenzratio 340 nm/ 380 nm bei Calciumsättigung

Abb. 11: Strukturformel des Calciumindikatorfarbstoffes FURA-2-AM (nach Grynkiewicz et al, 1985)



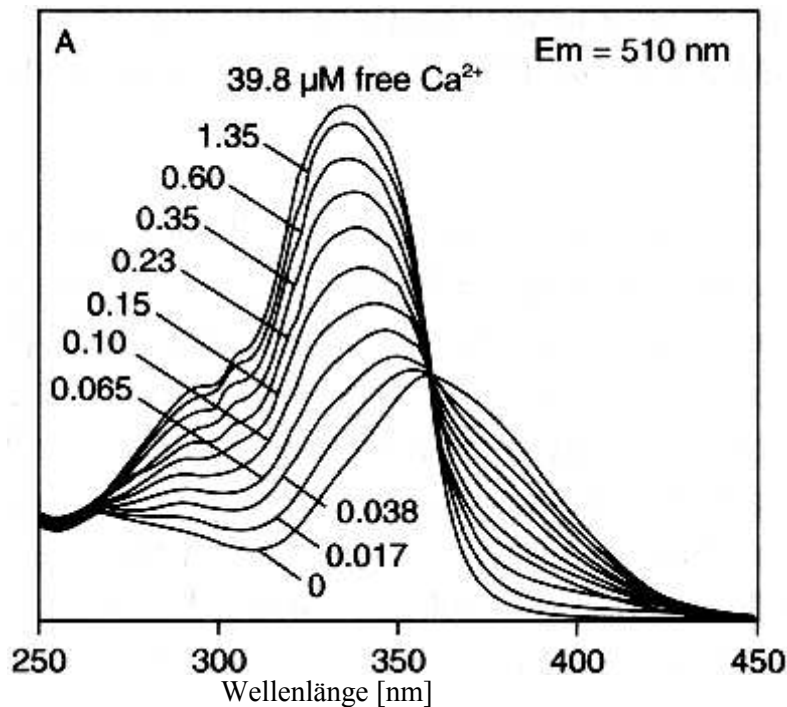


Abb. 12 : Exzitationsspektrum von FURA-2 in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration. (aus Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, 6. Auflage, S. 507)

Zellkultur und Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Die Zellen wurden entsprechend den o.a. Bedingungen (siehe Zellkultur) in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Als Kulturfläche dienten hierbei spezielle Glasscheiben, sog. Coverslips. Ziel der Kultivierung war ein mindestens 70%ig konfluenter einschichtiger Zellrasen.

Vor der Beladung der Zellen wurden die Kulturen zunächst dreimalig mit PBS-Lösung gewaschen, um Zelldetritus und überflüssiges Medium zu entfernen. Im Anschluss wurden pro Coverslip 2 ml HanksBSS/BSA und 4 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM hinzugegeben. Der Azetoxymethylester (AM) des Farbstoffes wird verwendet, damit die Farbstoffe die Zellmembranen der Zellen passieren können. Durch Esterasen erfolgen intrazellulär die Spaltung der Esterverbindung und die Freisetzung des Farbstoffes. Dieser besitzt eine deutlich geringere Lipidlöslichkeit als die Esterverbindung und kann so kaum in den Extrazellularraum zurückdiffundieren. Zur Verbesserung der Löslichkeit des Farbstoffester in der wässrigen Standardlösung wurde dieser zunächst in DMSO gelöst und danach in die Standardlösung geben. Um das Ausmaß der Präzipitation des Farbstoff-AM-Ester zu vermindern, enthielt die Farbstofflösung zusätzlich einen Lösungsvermittler (je 6 µl Pluronic F-127).

Dieser Ansatz wurde dann für 20 min. bei 37°C bei Dunkelheit inkubiert, um eine ausreichende Beladung der Zellen mit dem Farbstoff zu gewährleisten.

#### Photometrie

Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBS und anschließender Zugabe von 2ml HanksBSS/BSA wurden die Coverslips in Attofluor<sup>®</sup> Messkammern eingespannt und das Fluoreszenzsignal unter dem Inversionsmikroskop mittels eines Till-Photonics Photometers gemessen. Zunächst wurde der Basalwert in Ruhe bestimmt und 30 sec. später die Messung nach Gabe des Agonisten wiederholt (Trypsin, bzw. PAR-2-AP).

Die Emissionsintensitäten wurden als Verhältnis (340/380 nm) bei 510 nm mit einer Photodiode gemessen.

Abb. 13:

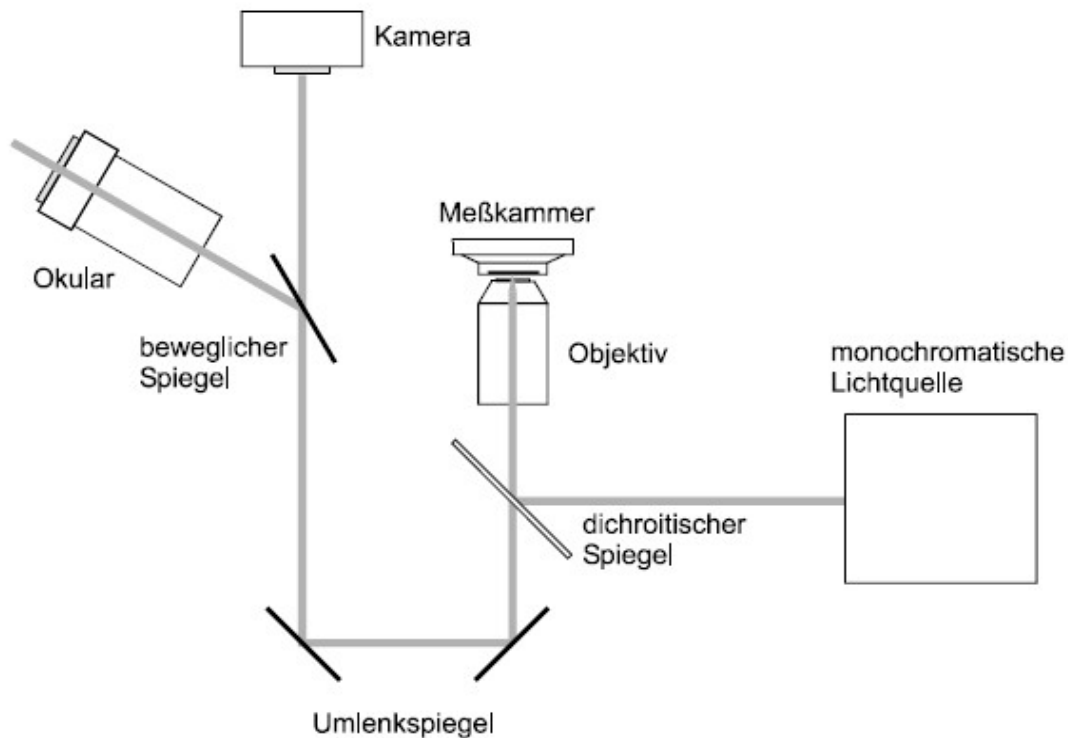


Abb.13: Schematische Darstellung der photometrischen Calciummessung mit Fluoreszenzfarbstoff

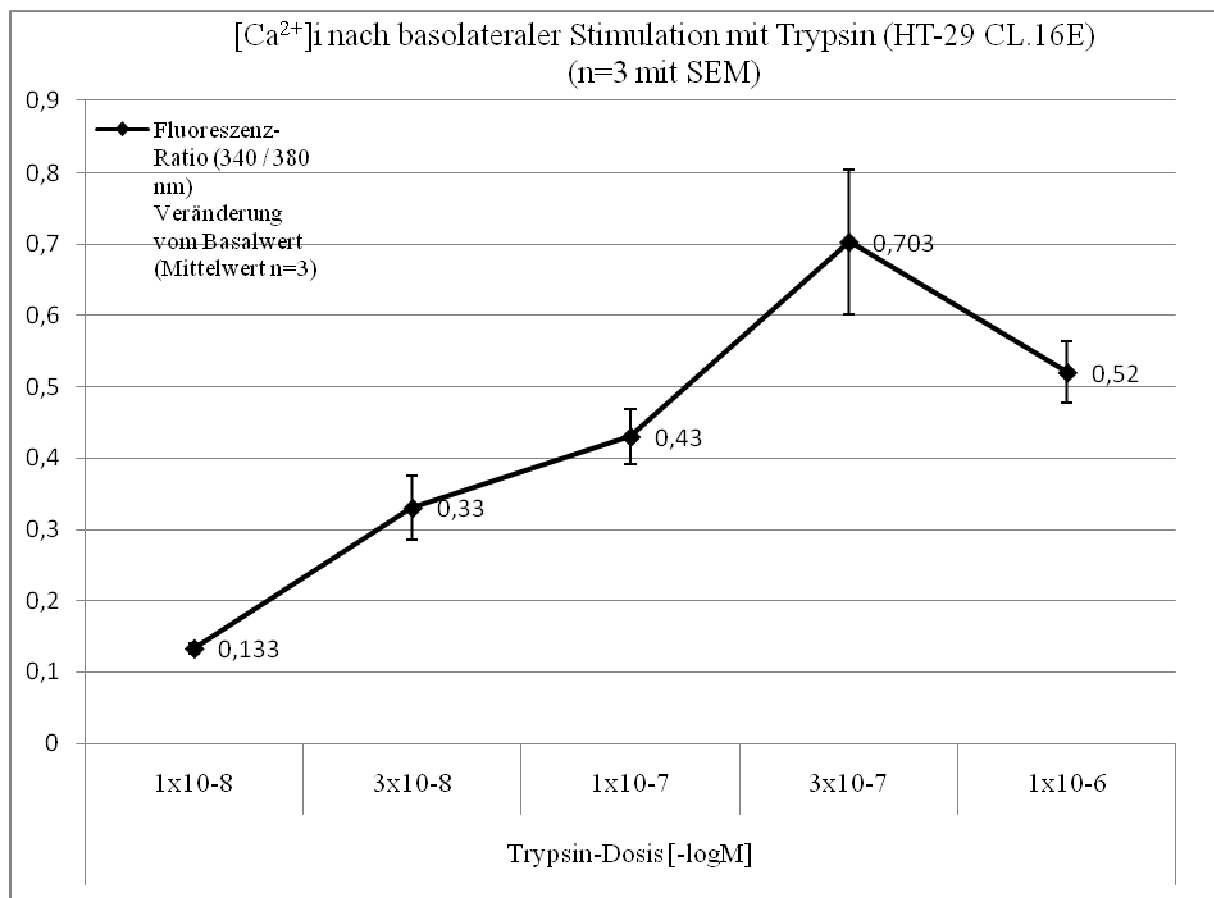
In der o.a. Abb. 13 findet sich der schematische Versuchsaufbau für die Calciummessung. In der Messkammer befinden sich die mit Fura-2 AM beladenen Zellen auf dem Coverslip. Über eine monochromatische Lichtquelle werden die Zellen mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt (340/380 nm). Die emittierten Strahlen werden über Umlenkspiegel zum einen in eine Kamera geleitet, die die Lichtintensität der Emission bestimmt und die Daten an einen angeschlossenen Rechner zur weiteren Auswertung weiterleitet. Darüber hinaus ist auch die direkte Beobachtung der Zellen über das Inversionsmikroskop möglich.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Calcium-Photometrie

Als Nachweis der Präsenz eines funktionellen PAR-2-Rezeptors wurde vor Durchführung der Messreihe in der Ussing-Kammer der Trypsin-vermittelte Calciumausstrom in der HT-29 CL.16 E-Zelllinie mittels der Calcium-Photometrie untersucht.

Abb. 14:





### **3.1.3. Theoretische Überlegungen bei der Auswahl der Zelllinien**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde für beide Zelllinien gezeigt (X. Guo et al, 1995; Barrett KE et al, 1993), dass sie den PAR-2 exprimieren. als auch über eine stimulierbare Chloridsekretion verfügen.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Zellenlinien einen transepithelialen Widerstand ausbilden, bzw. feste Interzellularbrücken über tight junctions und Desmosomen entwickeln.

Um die Effekte besser zu verstehen, die wahrscheinlich über den PAR-2 am Kolonepithel in vivo vermittelt werden, wurden diese beiden immortalisierten Kolonkarzinom-Zellenlinien in der vorliegenden Arbeit verwendet. Als indirektes Maß für die Regulation der epithelialen Barriere wurde der PAR-2-vermittelte Effekt auf den transepithelialen Widerstand (TER) gemessen. Ein weiterer, möglicherweise protektiv wirkender Effekt sollte durch die Messung der PAR-2-induzierten Chloridsekretion (indirekt über Bestimmung des Kurzschlussstromes) untersucht werden.

### 3.2. Zeitabhängige Entwicklung des transepithelialen Widerstandes

Nach Erreichen eines konfluenten Zellverbandes in den Flacon-Kulturflaschen wurden die Zellen beider Zelllinien auf speziell angefertigte Einsätze mit einer porösen Membran ausgesät (siehe Abbildung 6 und 7, Kapitel Material und Methoden). In den folgenden 10-12 Tagen wurde täglich die Entwicklung des TER mittels eines Volt-Ohm-Meters gemessen. Der Anstieg des TER wird nachfolgend am Beispiel des Mittelwertes für drei Inserts pro Zellreihe gezeigt (HT-29 Cl.16E und T84)

#### 3.2.1. Anstieg des TER in 10 Tagen (HT-29 Cl.16E):

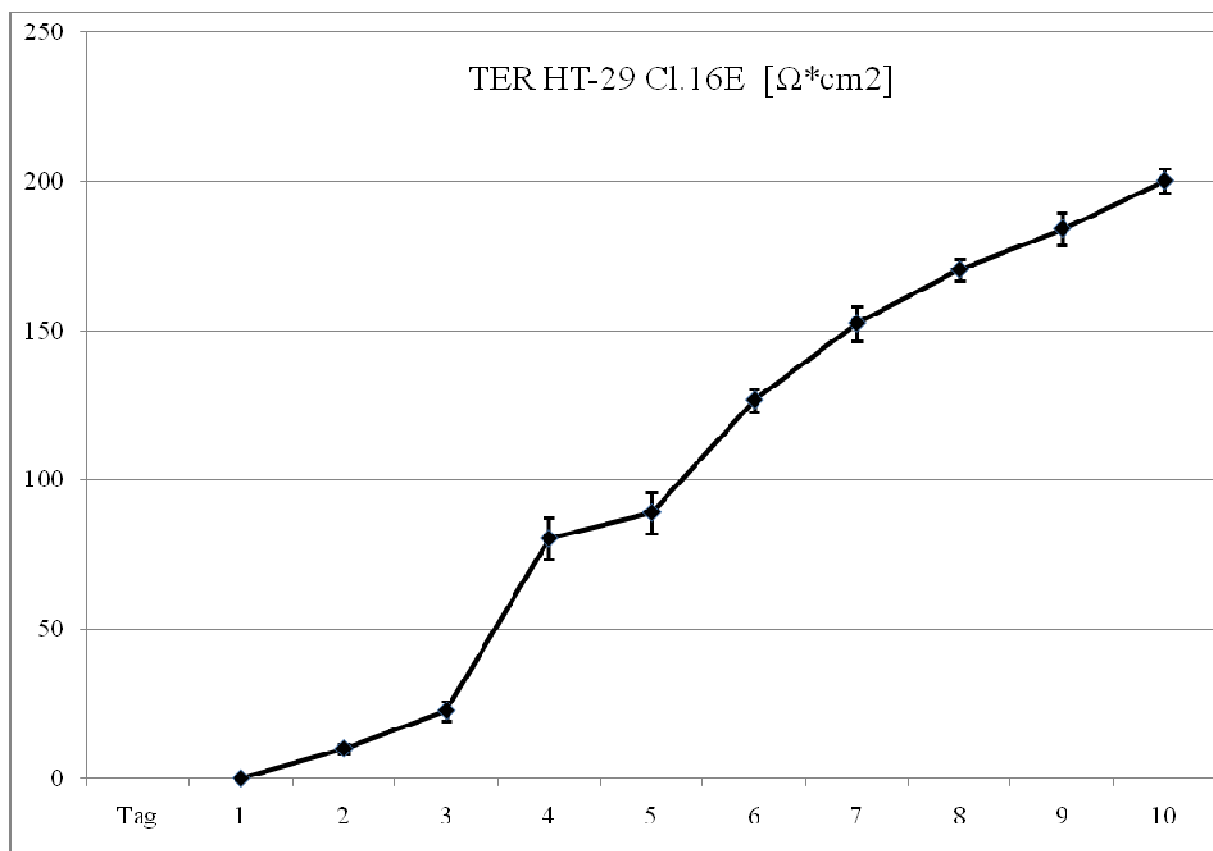


Abb.15: Gezeigt wird die zeitabhängige Entwicklung des gemittelten TER bei  $n=3$ . Nach 10 Tagen erreichen die Zellen der Linie HT-29 Cl.16E einen durchschnittlichen Wert von  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

### 3.2.2. Anstieg des TER in 10 Tagen (T84):

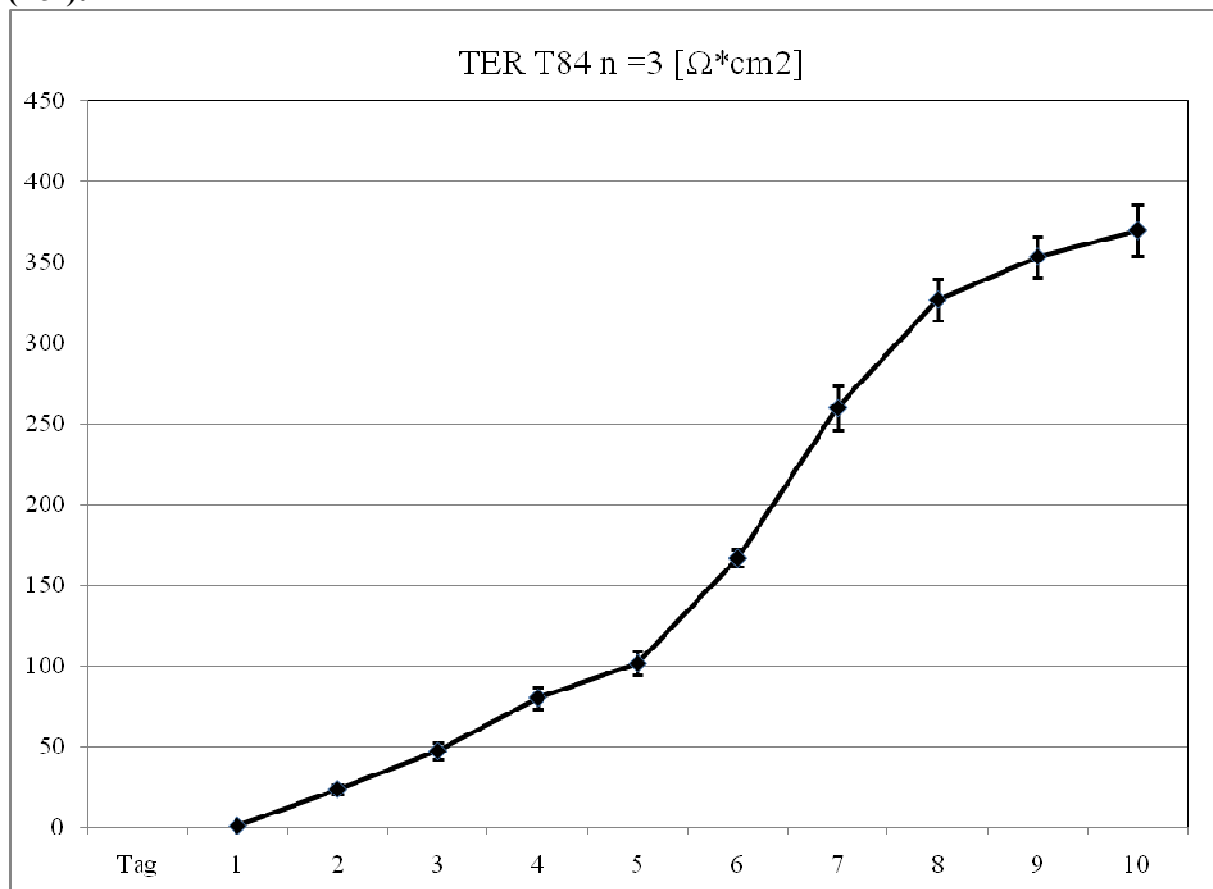


Abb.16: Gezeigt wird die zeitabhängige Entwicklung des gemittelten TER bei n=3. Nach 10 Tagen liegen die durchschnittlichen Werte für die T84-Zell-Linie bei ca.  $370 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Innerhalb von ca. 10-12 Tagen entwickelten beide Zelllinien unterschiedlich hohe Werte für den transepithelialen Widerstand. Mikroskopisch korreliert das Erreichen der Plateau-Phase des TER mit der vollständigen Konfluenz des Zellrasens. Dabei lag der durchschnittliche Wert für den maximal erreichten TER in der T84-Zelllinie (absolut:  $370 \Omega \cdot \text{cm}$ ) deutlich über dem Wert für die HT-29 Cl.16 E (absolut:  $200 \Omega \cdot \text{cm}$ ). Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine stärkere interzelluläre Verbindung in Form der tight junctions und Desmosomen.

### **3.2.3. Untersuchung des Einflusses von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf den Kurzschlussstrom und den transepithelialen Widerstand**

Die Prostaglandinsynthese findet nahezu in allen Abschnitten des GI-Traktes statt (Whittle, B.J.R. and Salmon, J.A., 1983). Grundsätzlich wird dem PGE<sub>2</sub> im Magen-Darm-Trakt eine protektive Funktion zugesprochen (Robert A et al, 1977; Robert A et al, 1979; Robert A et al, 1980).

Vermittelt wird diese protektive Wirkung über verschiedene Mechanismen. Neben einer Verminderung der gastralen Salzsäuresekretion (Robert A et al, 1977), Erhöhung des mukosalen Blutflusses (Konturek SJ et al, 1981) und vermehrten Sekretion eines viskösen Schleims (Johansson C et al, 1979), wird z.T. auch die Chlorid-, und damit die Flüssigkeitssekretion (Halm DR et al, 2001) über Prostaglandine reguliert. Im ersten Versuchsansatz soll durch Stimulation mit PGE<sub>2</sub> gezeigt werden, dass beide Zelllinien zur Chloridsekretion in der Lage sind. Gleichzeitig wurde dabei der Einfluss auf den TER beobachtet.

Die Stimulation von HT-29 Cl.16E und T84 Zellen mit Prostaglandin E<sub>2</sub> führt zu einem dosisabhängigen Anstieg des Isc. Dabei ist jedoch in der Zelllinie HT-29 Cl.16E ab einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-5}$  ein Ceiling-Effekt zu verzeichnen. Parallel hierzu findet sich bei steigenden PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen ein Abfall des TER. Die Ursache für den Abfall des TER liegt wahrscheinlich darin, dass durch die Stimulation der Chloridionensekretion auch die transepitheliale Permeabilität parallel zunimmt.

Die EC<sub>50</sub> für beide Zelllinien liegt bei etwa 50nM, wobei PGE<sub>2</sub> in HT-29 Cl.16E Zellen potenter ist.

# Dose Response des Kurzschlussstromes und des transepithelialen Widerstandes nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation, T84-Zellen

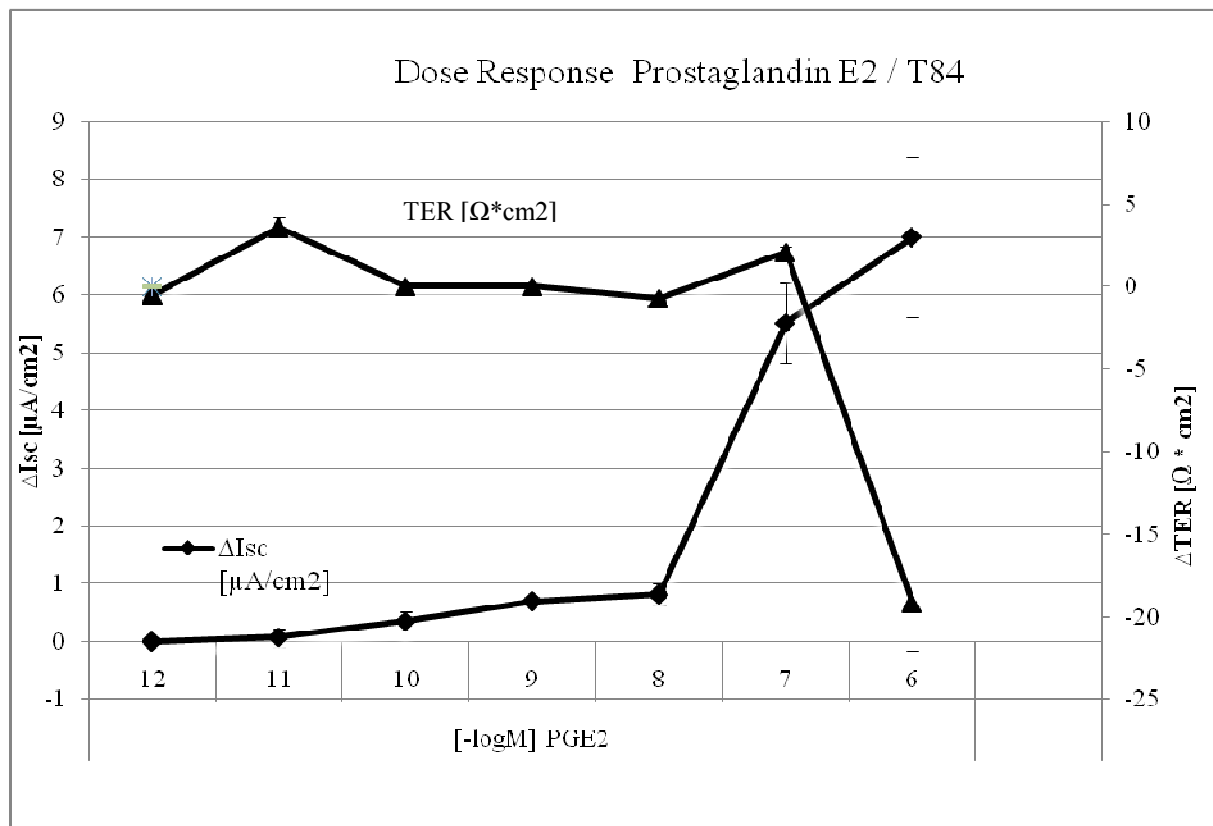


Abb.17: Mit steigenden Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> findet sich eine dosisabhängige Zunahme des Kurzschlussstromes, bzw. ein Abfall des transepithelialen Widerstandes.

### 3.2.3. Dose Response des Kurzschlussstromes und des transepithelialen Widerstandes nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation, HT-29 Cl.16E –Zellen

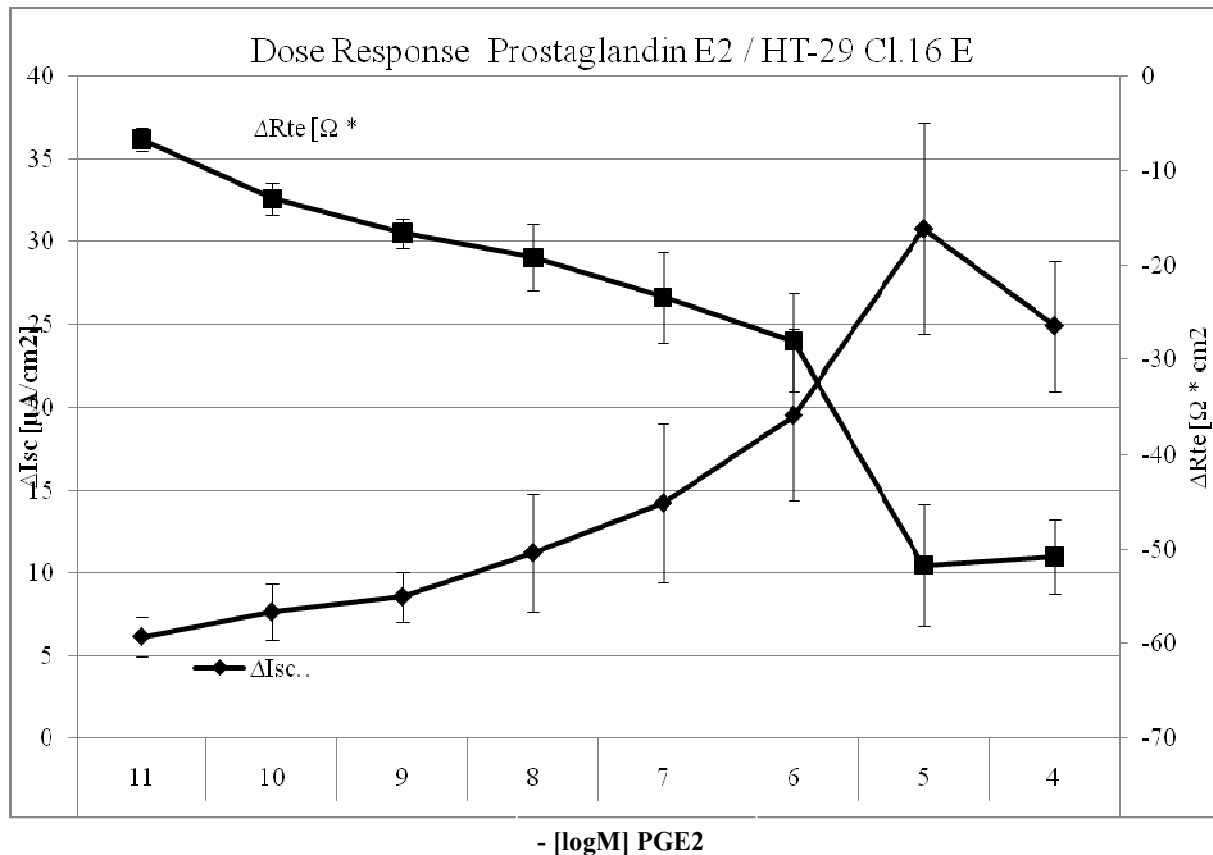


Abb.18: Auch in der Zelllinie HT-29 Cl.16E findet sich eine dosisabhängige Zunahme des Kurzschlussstromes, bzw. ein paralleler Abfall des TER. Ab einer Konzentration von  $10^{-5}$  kann kein höherer Anstieg des Isc mehr verzeichnet werden. Im direkten Vergleich mit der Dose Response-Kurve bei den T84-Zellen zeigt sich bei den HT-29 Cl.16E eine höhere Potenz für das PGE<sub>2</sub>.

### 3.3. Messgrößen und Ausgangswerte für den transepithelialen Widerstand, Kurzschlussstrom und Potenzialdifferenz in den Zelllinien HT-29 Cl.16E und T84.

Nach Einspannen der Inserts in die Ussingkammer erfolgte im 5-Sekundentakt die Erfassung von Kurzschlussstrom, transepithelialelem Widerstand und Potenzialdifferenz.

Zu Anfang des Versuches zeigten die Werte für die oben aufgeführten Messgrößen einen allmählich schwächer werdenden Abfall ( $I_{sc}$ ), bzw. Anstieg (TER), bis nach ca. 45- 60 min. ein stabiles Plateau der Werte erreicht („base line“) wurde.

Bei allen folgenden Versuchsreihen wurden Messungen grundsätzlich parallel in 6 Ussing-Kammern gleichzeitig durchgeführt und aufgezeichnet. Nach Zugabe der Agonisten/ bzw. Antagonisten (je nach Versuch Trypsin, PAR-2 AP oder Carbachol) erfolgte eine Aufzeichnung für mindestens eine Stunde, um auch verzögert auftretende Effekte der Substanzen zu erfassen.

Nachfolgend sind die Mittelwerte der Ausgangs-Messwerte (= baselines) für beide Zelllinien aufgeführt (n=25).

#### Zelllinie HT-29 Cl.16 E

##### Baselines

	Transepithelialer Widerstand n=25 $R_T (\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Mittelwert	148,48
SEM	$\pm 7,83$

	Kurzschlussstrom n=25 $I_{sc} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)$
Mittelwert	1,15
SEM	$\pm 0,29$

	Potenzialdifferenz n=25 PD (mV)
Mittelwert	0,2276
SEM	$\pm 0,09139708$

#### Zelllinie T84

##### Baselines

	Transepithelialer Widerstand n=25 $R_T (\Omega \cdot \text{cm}^2)$
Mittelwert	170,5868
SEM	$\pm 16,5255135$

	Kurzschlussstrom n=25 $I_{sc} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)$
Mittelwert	5,3
SEM	$\pm 1,29$

	Potenzialdifferenz n=25 PD (mV)
Mittelwert	-6,62
SEM	$\pm 0,753$

### 3.4. Einfluss von Trypsin und des PAR-2 Agonisten (=AP aktivierendes Peptid) auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in der Zelllinie HT-29 Cl.16E

Dargestellt ist hierbei die Veränderung des Widerstandes ( $\Delta \text{TER}$ ) und des Kurzschlussstromes ( $\Delta I_{sc}$ ) nach Zugabe der Agonisten in Abhängigkeit von zunehmender Konzentration. Mit aufgeführt ist darüber hinaus der Effekt von reversem Peptid (weißer Kreis) und inhibiertem Trypsin (schwarzes Quadrat).

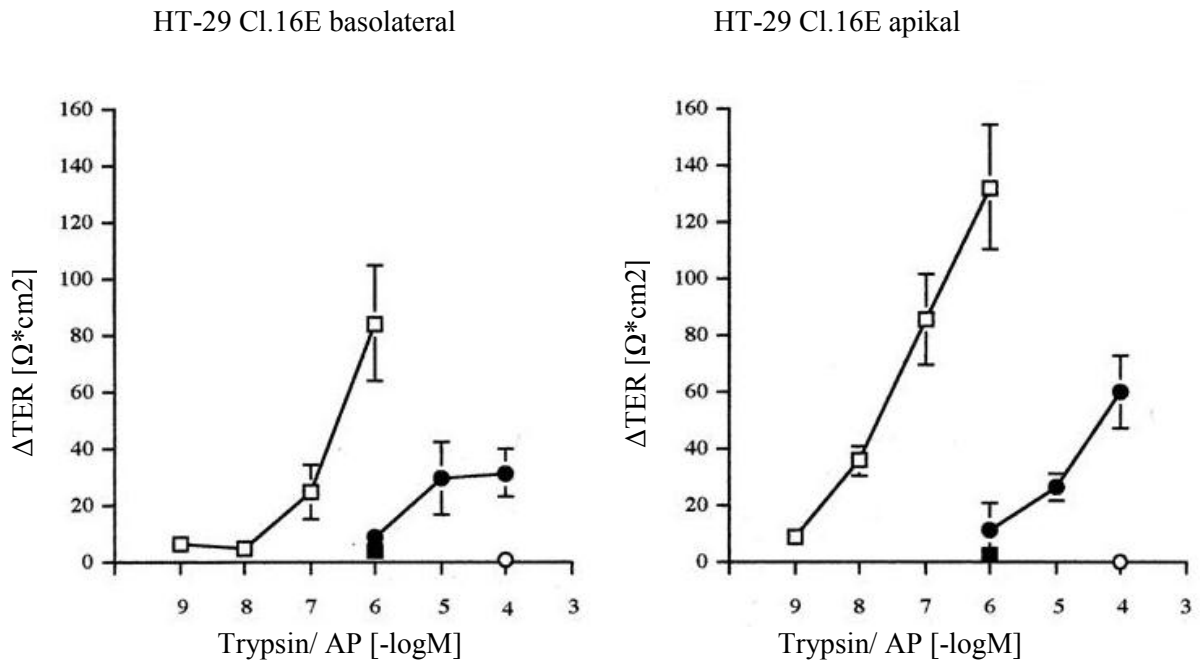


Abb.19: basolaterale und apikale Stimulation mit Trypsin (weiße Quadrate) und AP (schwarze Kreise) und Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER). Kontrolle mit Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI/ weißer Kreis), HT-29 Cl.16E

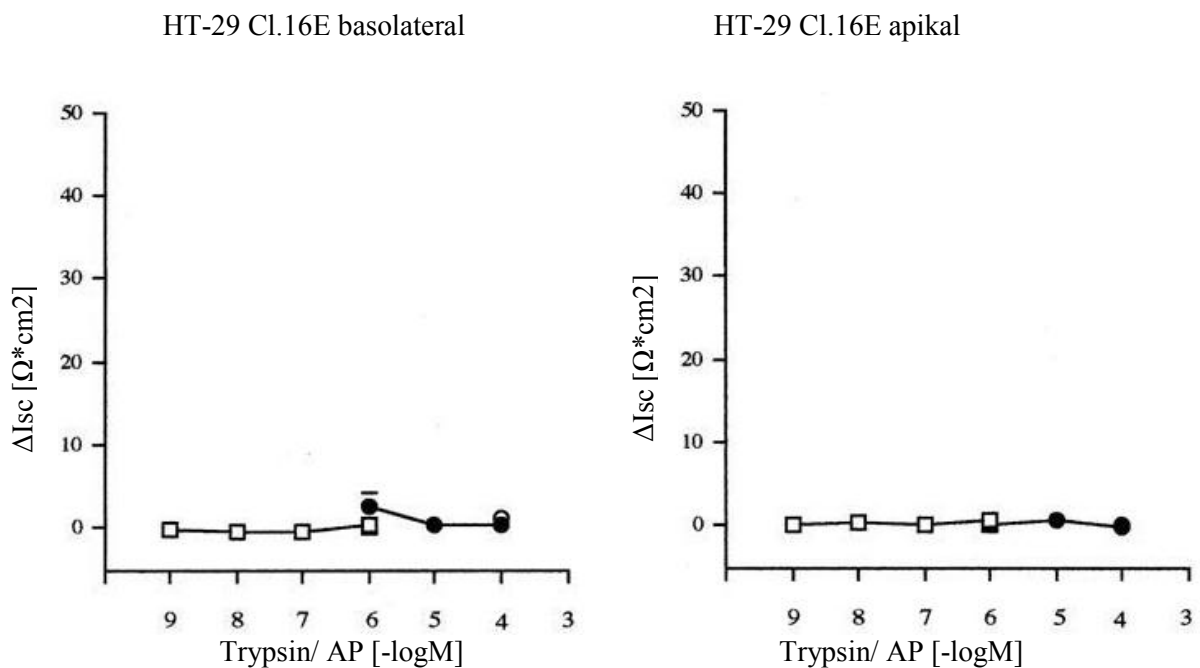


Abb.20: basolaterale und apikale Stimulation mit Trypsin (weiße Quadrate) und AP (schwarze Kreise) und Veränderung des Kurzschlussstromes (Isc), Kontrolle mit SBTI (weißer Kreis), HT-29 Cl.16E



Abb.19 und 20: TER und Isc nach Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit PAR-2 Agonisten. Basolaterale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit ansteigenden Dosen Trypsin (weiße Quadrate) und PAR-2 AP (schwarze Kreise) führt zu einem starken Anstieg des TER. Trypsin inhibiert mit SBTI (schwarzes Quadrat) und reverses Peptid (weißer Kreis) haben dagegen keinen Effekt. Der Isc bleibt unbeeinflusst.

Apikale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit ansteigenden Dosen Trypsin (weiße Quadrate) und PAR-2 AP (schwarze Kreise) führt im Vergleich zur basolateralen Stimulation zu einem noch stärkeren Anstieg des TER, der Isc bleibt unverändert.

Gezeigt sind die Mittelwert von n=6 Experimenten  $\pm$  SEM.

### 3.5. Einfluss von Trypsin und des PAR-2 Agonisten (=AP aktivierendes Peptid) auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in der Zelllinie T84

Auch hier ist wieder die Veränderung des Widerstandes ( $\Delta \text{TER}$ ) und des Kurzschlussstromes ( $\Delta \text{Isc}$ ) nach Zugabe der Agonisten in steigenden Konzentration gezeigt. Kontrollmessungen mit reversem Peptid und inhibiertem Trypsin sind ebenfalls aufgetragen.

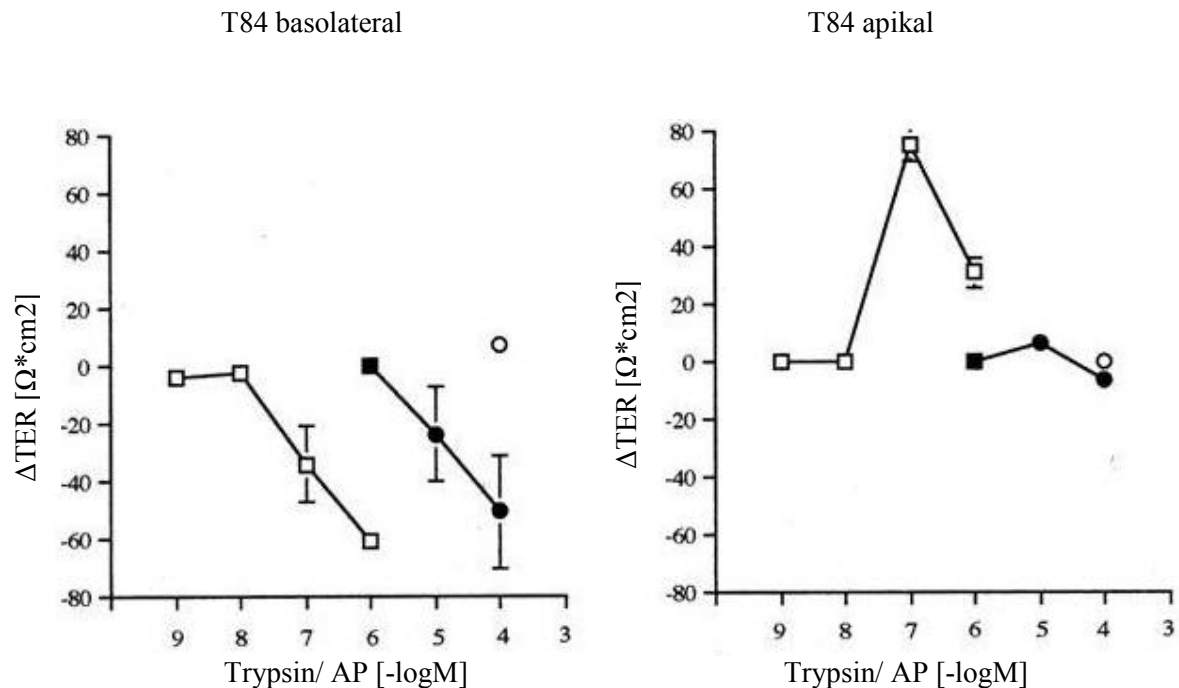


Abb. 21: basolateral und apikale Stimulation mit Trypsin (weiße Quadrate) und AP (schwarze Kreise) und Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER). Kontrolle mit SBTI (weißer Kreis), T84

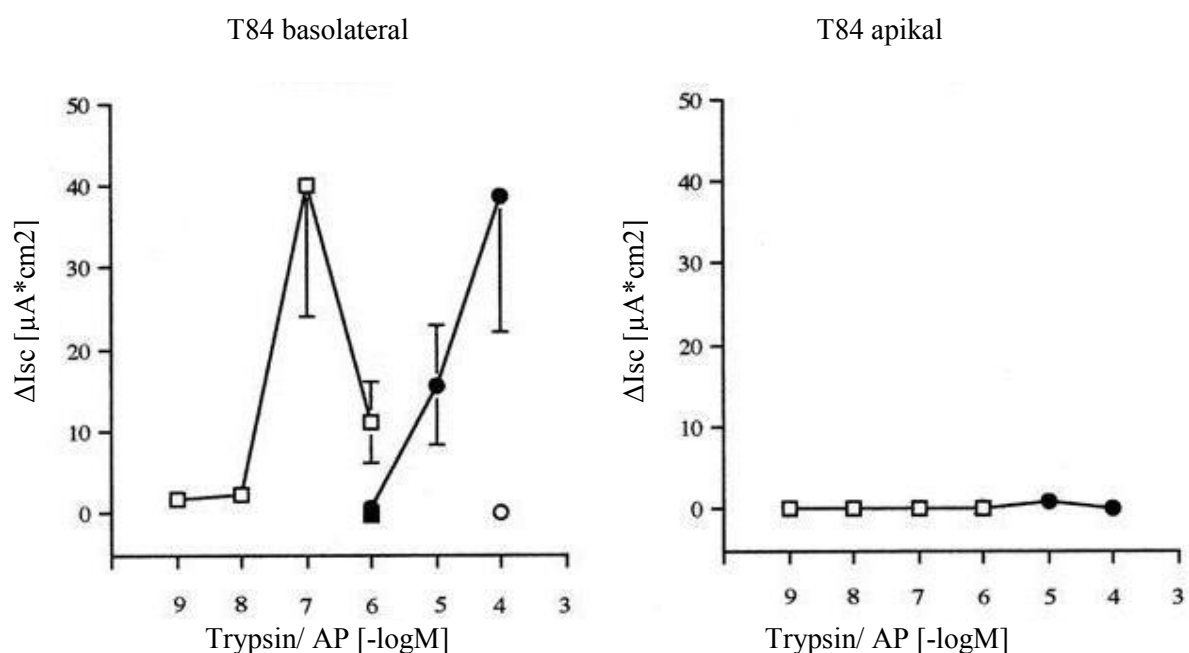


Abb. 22:

basolateral und apikale Stimulation mit Trypsin (weiße Quadrate) und AP (schwarze Kreise) und Veränderung des Kurzschlussstromes (Isc), Kontrolle mit SBTI (weißer Kreis), T84

Abb. 21 und 22:

TER und Isc nach Stimulation von T84 Zellen mit PAR-2 Agonisten

Basolaterale Stimulation von T84 Zellen mit ansteigenden Dosen Trypsin (weiße Quadrate) und PAR-2 AP (schwarze Kreise) führt zu einem Anstieg des Isc, wobei der TER gleichzeitig abfällt. Trypsin inhibiert mit SBTI (schwarzes Quadrat) und reverses Peptid (weißer Kreis) haben dagegen keinen Effekt.

Apikale Stimulation von T84 Zellen mit ansteigenden Dosen Trypsin (weiße Quadrate) führen zu einer deutlichen biphasischen Stimulation des TER, während die Stimulation durch PAR-2 AP (schwarze Kreise) nur sehr gering ausfällt. Der Isc bleibt durch PAR-2 Agonisten unbeeinflusst. Gezeigt sind die Mittelwert von n=6 Experimenten  $\pm$  SEM.

### 3.6. Basolaterale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit Trypsin und PAR-2 AP, Zeitverlauf des TER-Anstiegs

HT-29 Cl.16 E, Trypsin basolateral ( $\Delta$  TER)

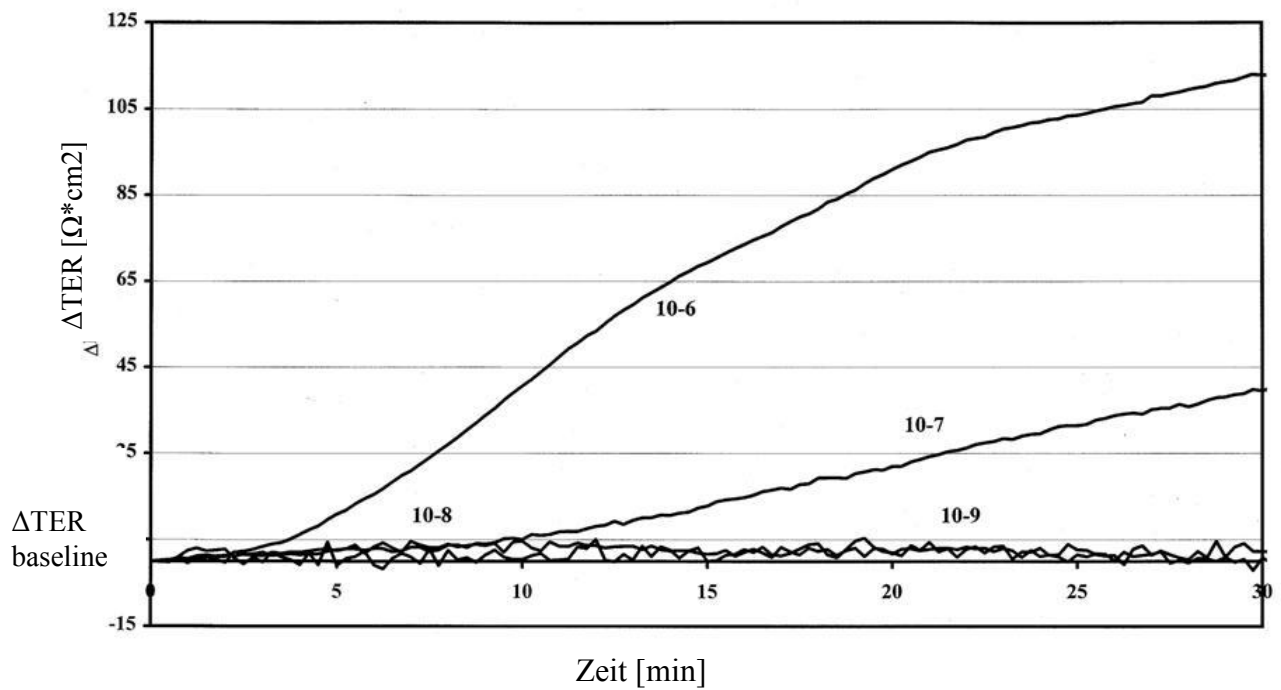


Abb. 23: Veränderung des TER nach basolateraler Stimulation mit Trypsin beobachtet über die Zeit, HT-29 Cl.16 E

# HT-29 Cl.16 E, PAR-2 AP basolateral ( $\Delta$ TER)

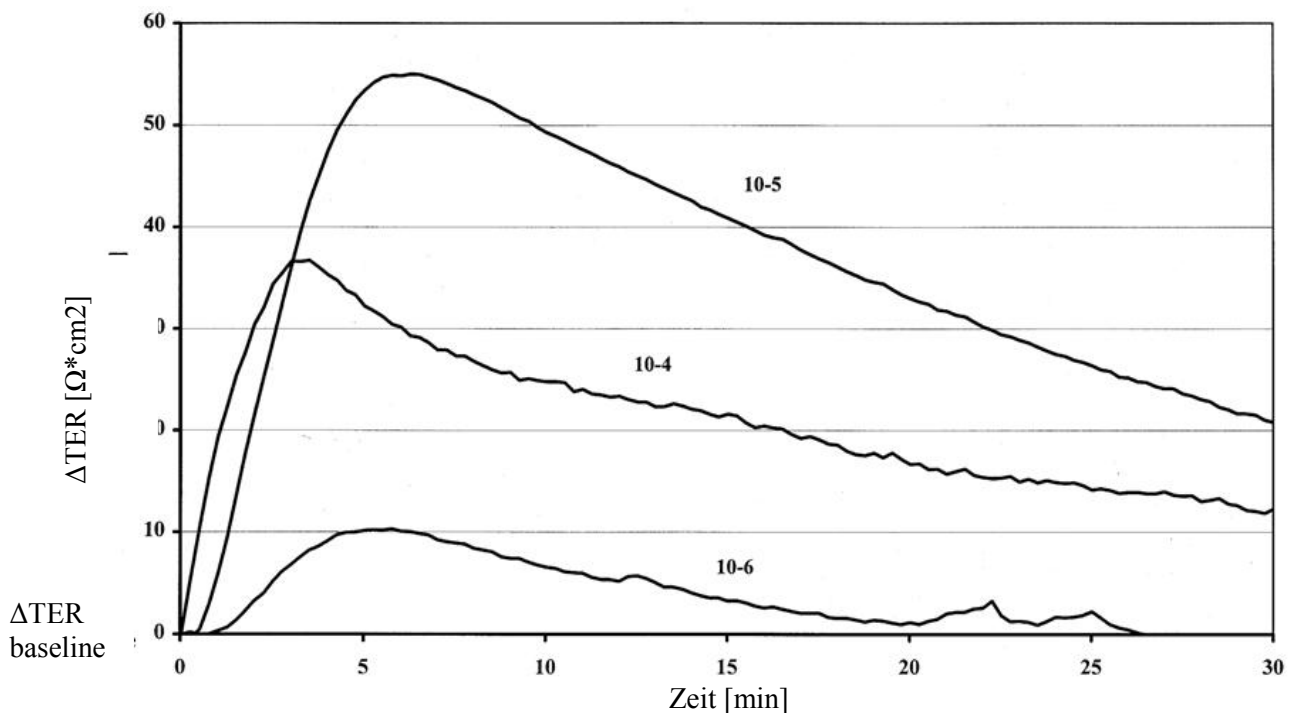


Abb.24: Veränderung des TER nach basolateraler Stimulation mit AP beobachtet über die Zeit, HT-29 Cl.16 E

Abb. 23 u. 24: HT-29 Cl.16E Zellen wurden von basolateral mit unterschiedlichen Dosen Trypsin und PAR-2 AP stimuliert und der TER über 30min beobachtet. Trypsin führt zu einem langsamen Anstieg des TER, der etwa bei 30min das Maximum erreicht, PAR-2 AP führt dagegen zu einem wesentlich rascheren Anstieg, der abhängig von der Dosis nach 3 bis 7 Minuten das Maximum erreicht und dann langsam wieder abfällt. Weiterhin findet sich im Vergleich ein quantitativer Unterschied hinsichtlich des maximalen Anstiegs des transepithelialen Widerstandes. Nach Stimulation mit Trypsin kann im Vergleich zum AP ein nahezu doppelt so hoher Anstieg des TER verzeichnet werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass theoretisch ein Trypsin-Molekül gleich mehrere Rezeptoren aktivieren kann, wohingegen jeweils nur ein AP auch nur einen Rezeptor aktivieren kann.

Auch die prolongiert anhaltende Erhöhung des TER unter Trypsin ist auf diese spezielle physiologische Aktivierung zurückzuführen. Die Kurven zeigen den Mittelwert für 1 repräsentatives Experiment.

### 3.7. Apikale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit Trypsin und PAR-2 AP, Zeitverlauf des TER-Anstiegs

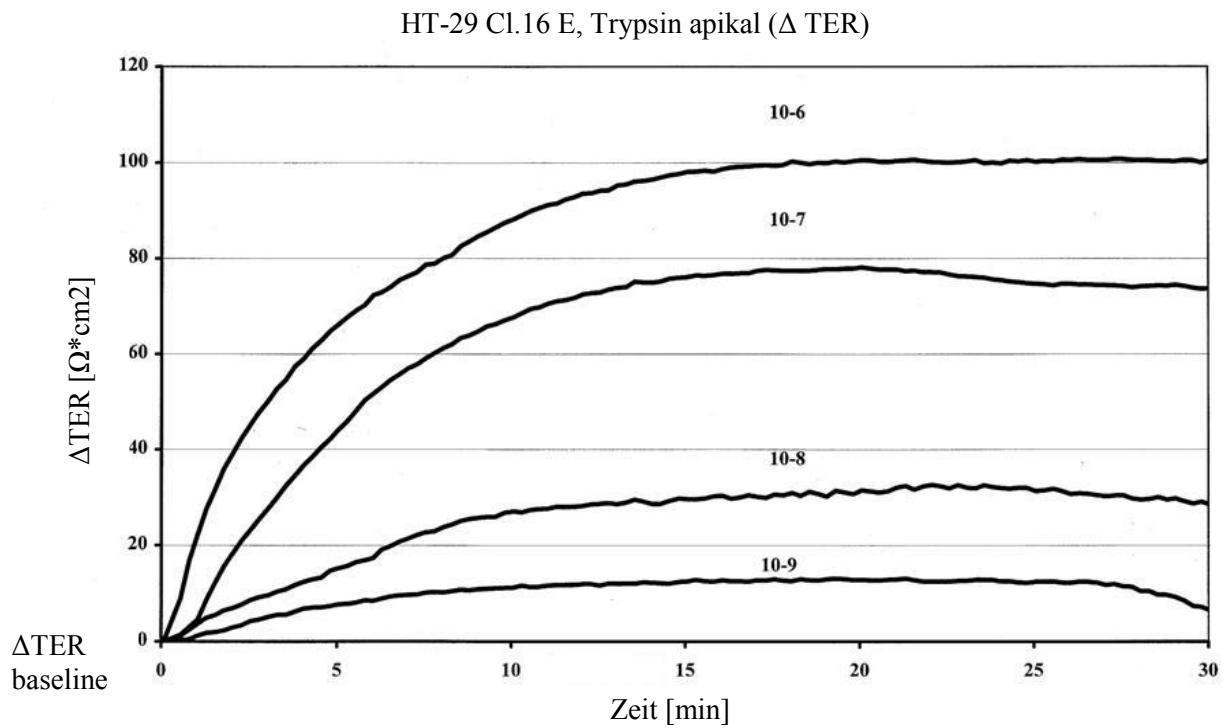


Abb. 25: Verlauf des TER nach apikaler Stimulation mit Trypsin, HT-29 Cl.16E

HT-29 Cl.16 E, PAR-2 AP apikal ( $\Delta$  TER)

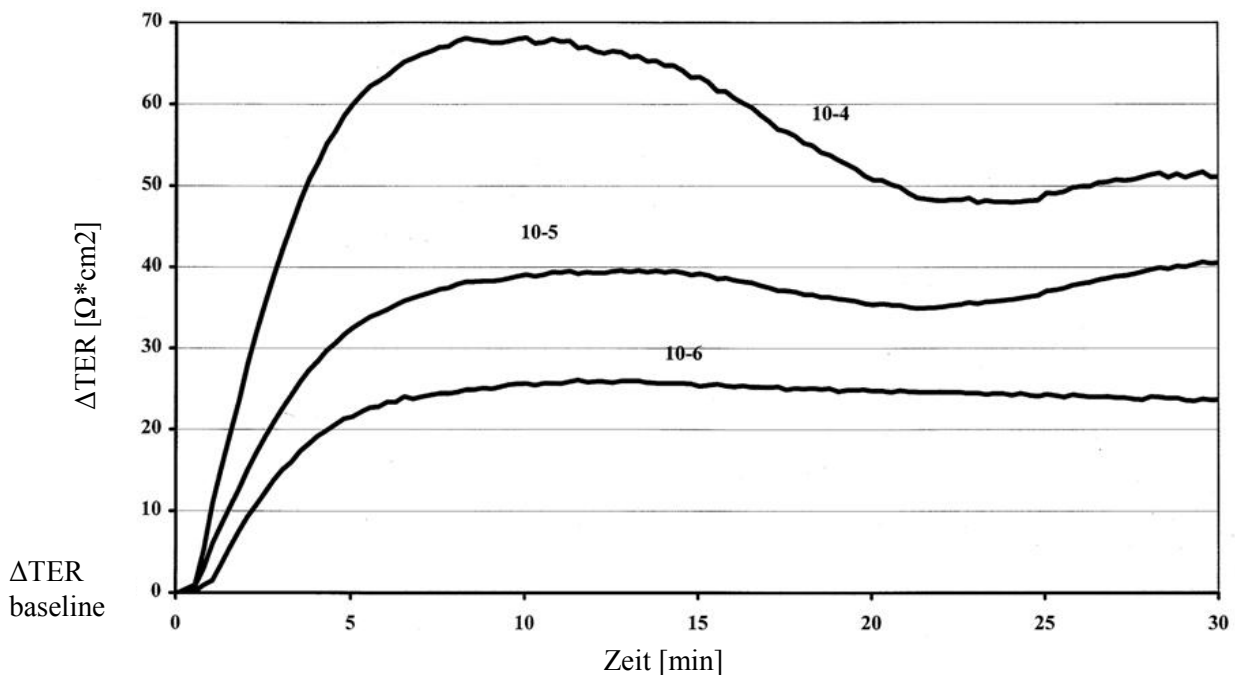


Abb. 26: Verlauf des TER nach apikaler Stimulation mit AP, HT-29 Cl.16E

Abb. 25 u. 26: HT-29 Cl.16E Zellen wurden von apikal mit unterschiedlichen Dosen Trypsin und PAR-2 AP stimuliert und der TER über 30min beobachtet. Trypsin führt zu einem langsamen Anstieg des TER, der abhängig von der Dosis nach etwa 10 bis 20min das Maximum erreicht und dann auf einem Plateau bleibt. PAR-2 AP führt dagegen zu einem rascheren Anstieg, der abhängig von der Dosis nach 8 bis 10 Minuten das Maximum erreicht und dann langsam wieder abfällt. Wie bereits bei der basolateralen Stimulation zeigt sich im Vergleich der beiden Agonisten, dass auch bei der apikalen Stimulation Trypsin in der Zelllinie der HT-29 Cl.16E deutlich potenter hinsichtlich der TER-Erhöhung ist (Maximale TER-Erhöhung unter Trypsin ca. 100  $\Omega$ \*cm<sup>2</sup>, unter AP ca. 68  $\Omega$ \*cm<sup>2</sup>). Die Kurven zeigen den Mittelwert für 1 repräsentatives Experiment.

### 3.8. Basolaterale Stimulation von T84 Zellen mit Trypsin und, Zeitverlauf von TER und Isc

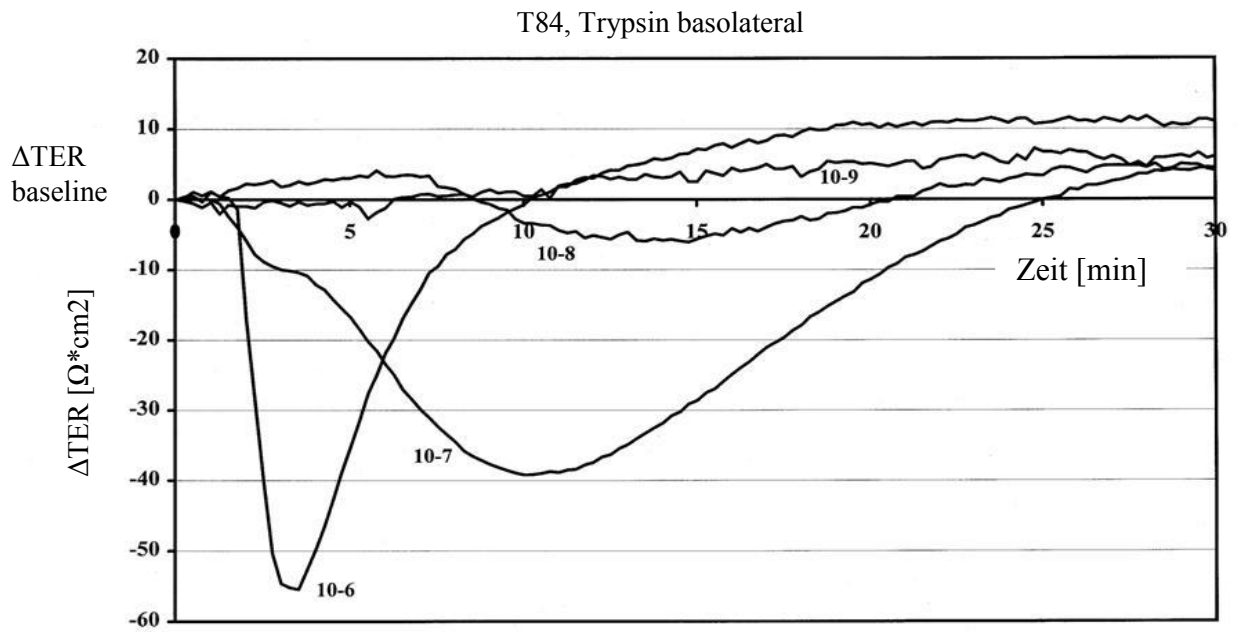


Abb.27: Verlauf des TER nach basolateraler Stimulation mit Trypsin, T84

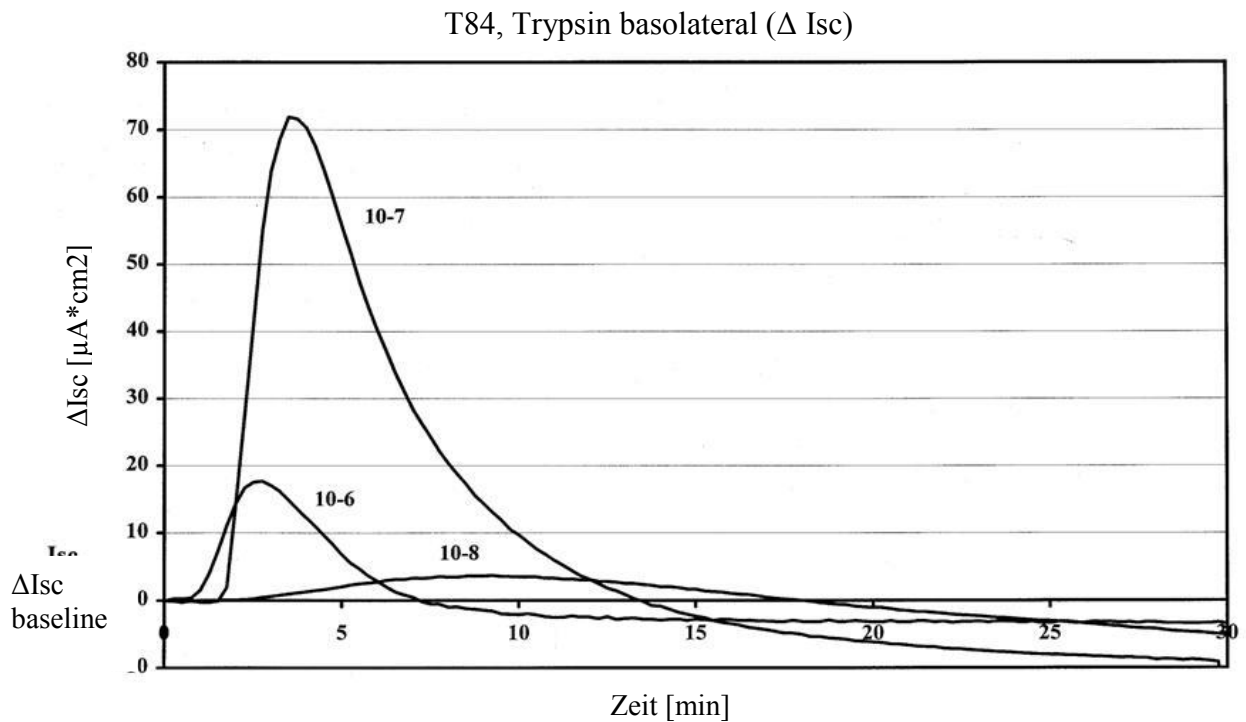


Abb. 28: Verlauf des Isc nach basolateraler Stimulation mit Trypsin, T84



Abb. 27 u. 28:

T84 Zellen wurden von basolateral mit unterschiedlichen Dosen Trypsin stimuliert und der TER und Isc über 30min beobachtet. Trypsin führt zu einem raschen Anstieg des Isc, der abhängig von der Dosis bei 2.5 bis 3.5min das Maximum erreicht und dann rasch wieder abfällt. Der TER fällt dosisabhängig rasch oder verzögert ab und erreicht das Minimum bei 4 bis 13min um dann allmählich wieder anzusteigen.

Die Kurven zeigen den Mittelwert für 1 repräsentatives Experiment.

### 3.9. Basolaterale Stimulation von T84 Zellen mit PAR-2 AP, Zeitverlauf von TER und Isc

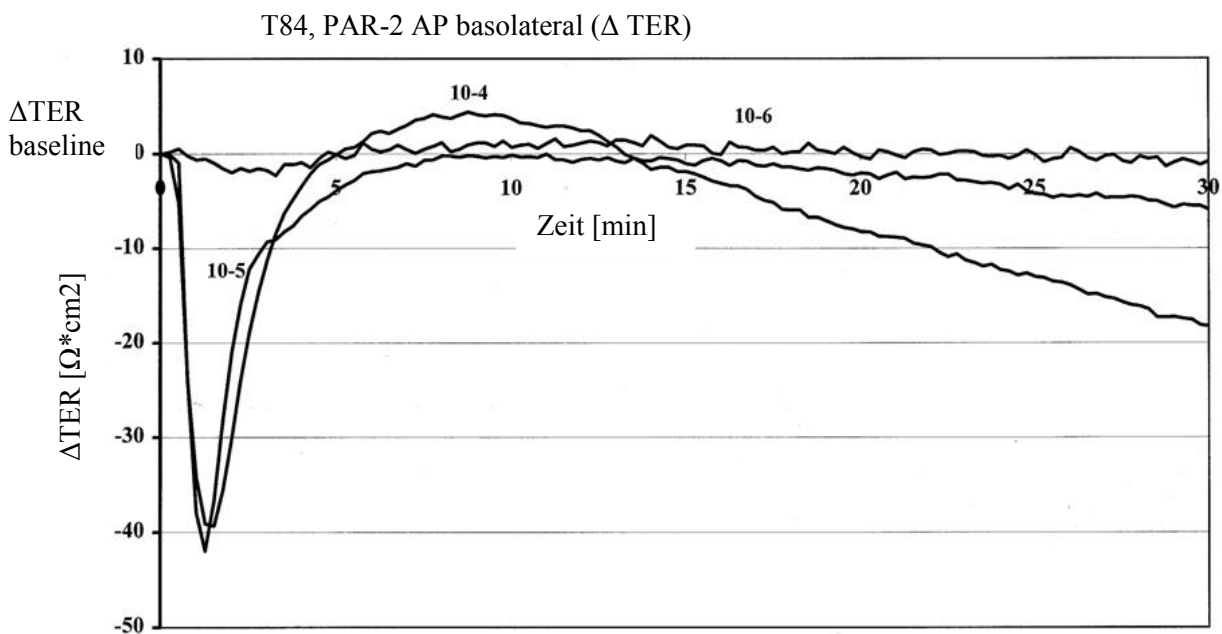


Abb. 29: Verlauf des TER nach basolateraler Stimulation mit AP, T84

T84, PAR-2 AP, basolateral ( $\Delta$ Isc)

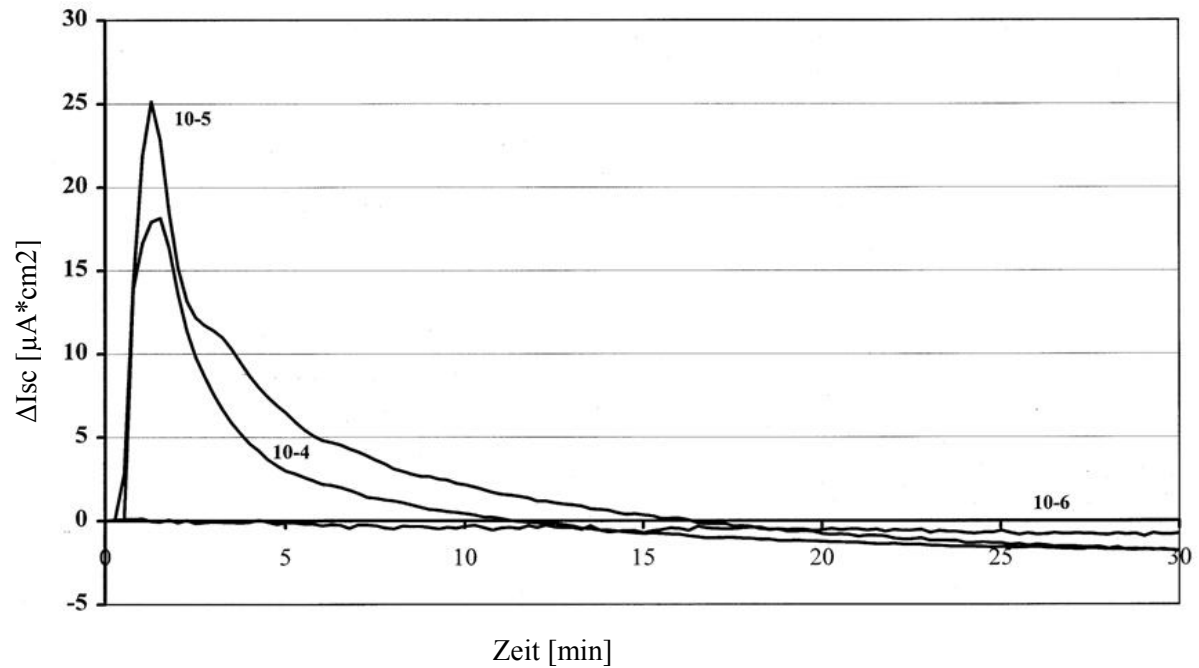


Abb. 30: Verlauf des Isc nach basolateraler Stimulation mit AP, T84

Abb. 29 und 30: T84 Zellen wurden von basolateral mit unterschiedlichen Dosen PAR-2 AP stimuliert und TER und Isc über 30min beobachtet. PAR-2 AP bewirkt einen sehr raschen Anstieg des Isc, der bei den hohen Dosen bereits bei 60 bis 90s das Maximum erreicht, um dann rasch wieder abzufallen. In etwa zeitgleich kommt es zu einem PAR-2 AP induzierten Abfall des TER. Die Kurven zeigen den Mittelwert für 1 repräsentatives Experiment.

### 3.10. Veränderungen des transepithelialen Widerstandes unter Carbachol

Die Versuche zeigten in beiden Zelllinien einen Anstieg des TER, sowohl bei apikaler, als auch basolateraler Stimulation, ohne dabei jedoch signifikant den Kurzschlussstrom zu beeinflussen. Nachfolgend dargestellt ist die Veränderung des transepithelialen Widerstandes über die Zeit nach basolateraler und apikaler Stimulation für beide Zelllinien:

#### 3.10.1. Basolaterale und apikale Stimulation von HT-29 Cl.16E Zellen mit Carbachol

##### a) Zeitverlauf

Basolaterale Stimulation mit Carbachol (10  $\mu\text{mol}$  und 100  $\mu\text{mol}$ ) und zeitlicher Verlauf des TER, HT-29 Cl.16E

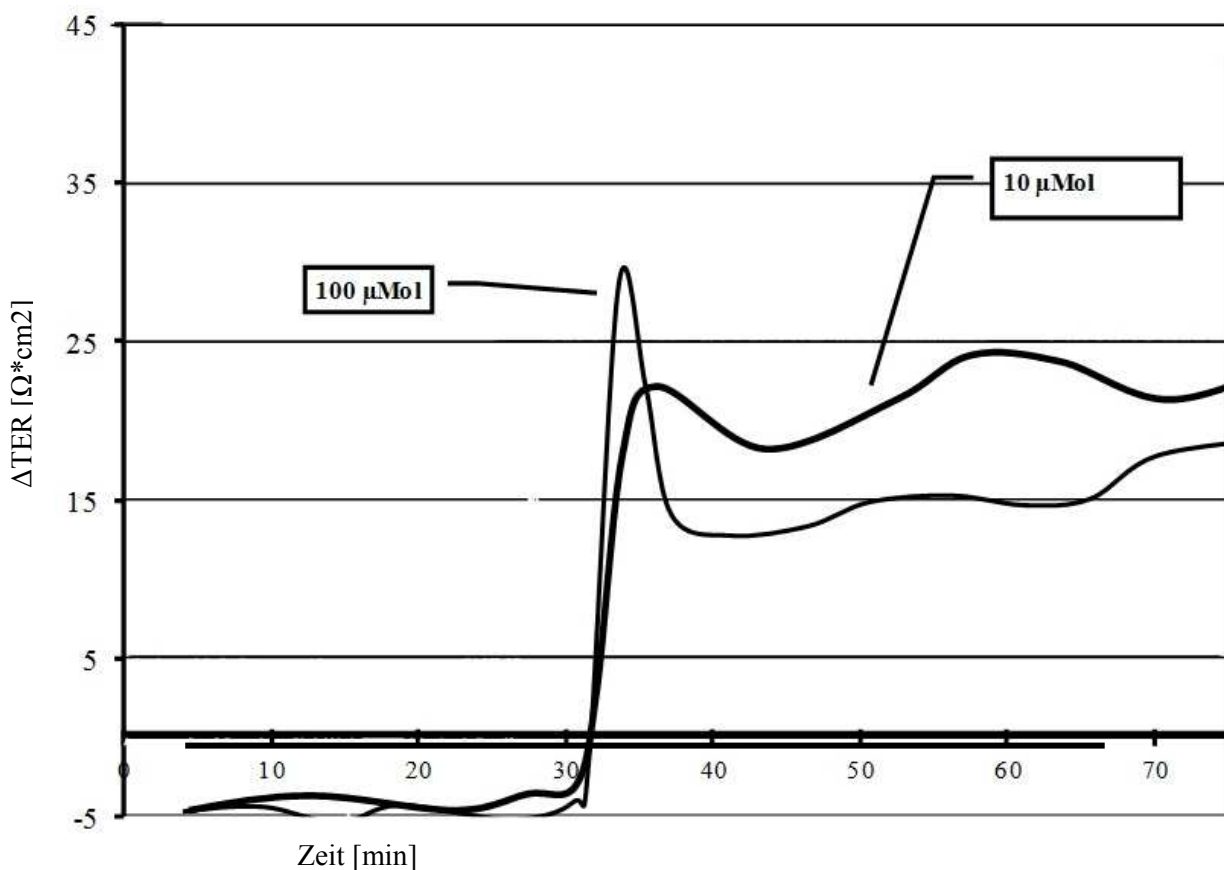


Abb. 31: Verlauf des transepithelialen Widerstandes nach basolateraler Stimulation mit Carbachol, HT-29 Cl.16E, Carbachol 10  $\mu\text{mol}$  bei 23 min; Carbachol 100  $\mu\text{mol}$  bei 24.min.

Apikale Stimulation mit Carbachol und zeitlicher Verlauf des TER,  
HT-29 Cl.16E

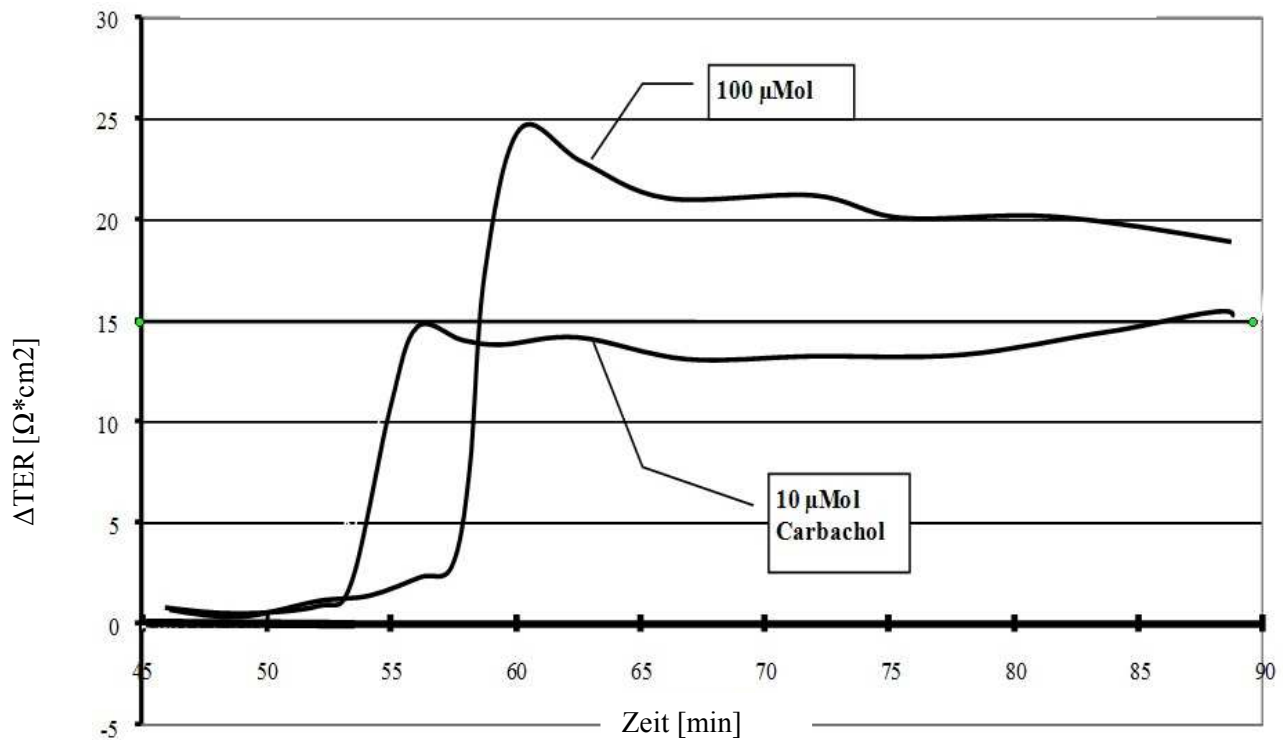


Abb. 32: Verlauf des transepithelialen Widerstandes nach apikaler Stimulation mit Carbachol, HT-29 Cl.16E, Carbachol 10μmol bei 52 min; Carbachol 100μmol bei 57 min.

Abb. 31 und 32: Sowohl nach basolateraler, als auch nach apikaler Stimulation der HT-29 Cl.16E Zellen kann durch die Gabe von Carbachol ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes verzeichnet werden. Hinsichtlich des erreichbaren Maximums für den TER scheint es keinen Unterschied zu geben, ob nun die Stimulation an der basolateralen oder der apikalen Membran erfolgt.

b) Dosis-Wirkungsbeziehung

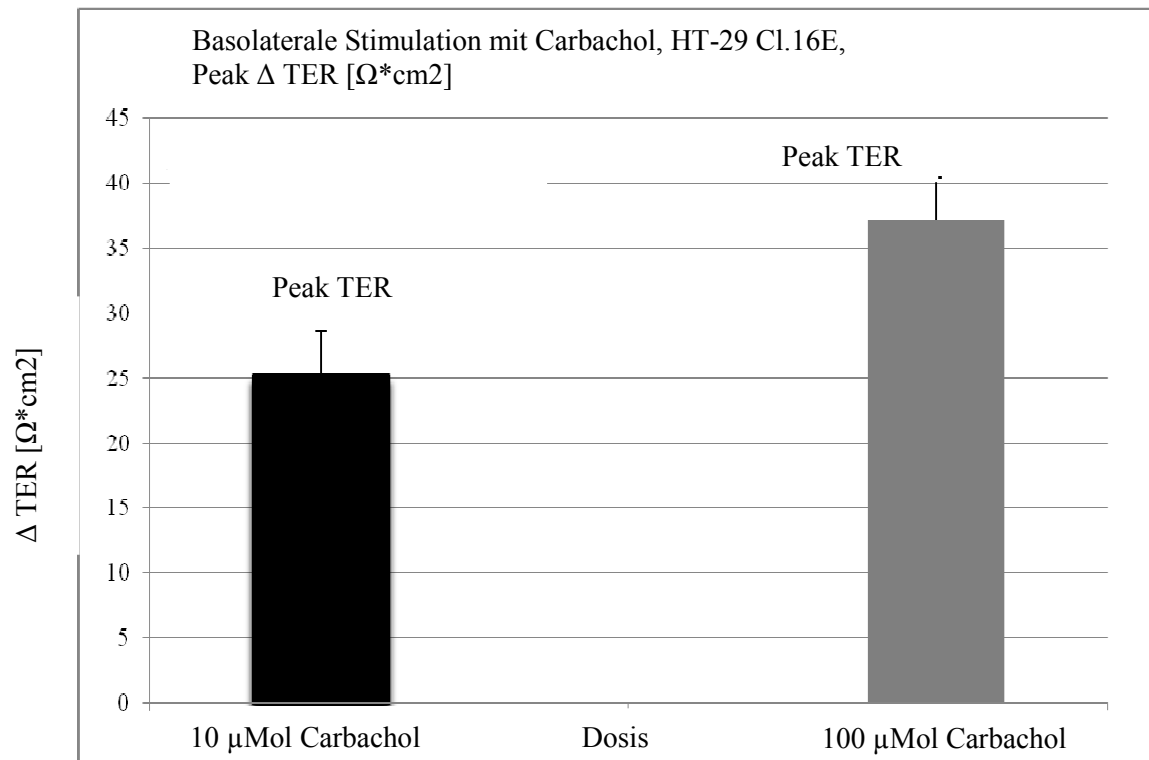


Abb. 33: Gezeigt ist der maximale Anstieg des TER nach basolateraler Stimulation mit Carbachol 10 und 100  $\mu\text{Mol}$ . Mittelwerte für  $n=3$  mit SEM.

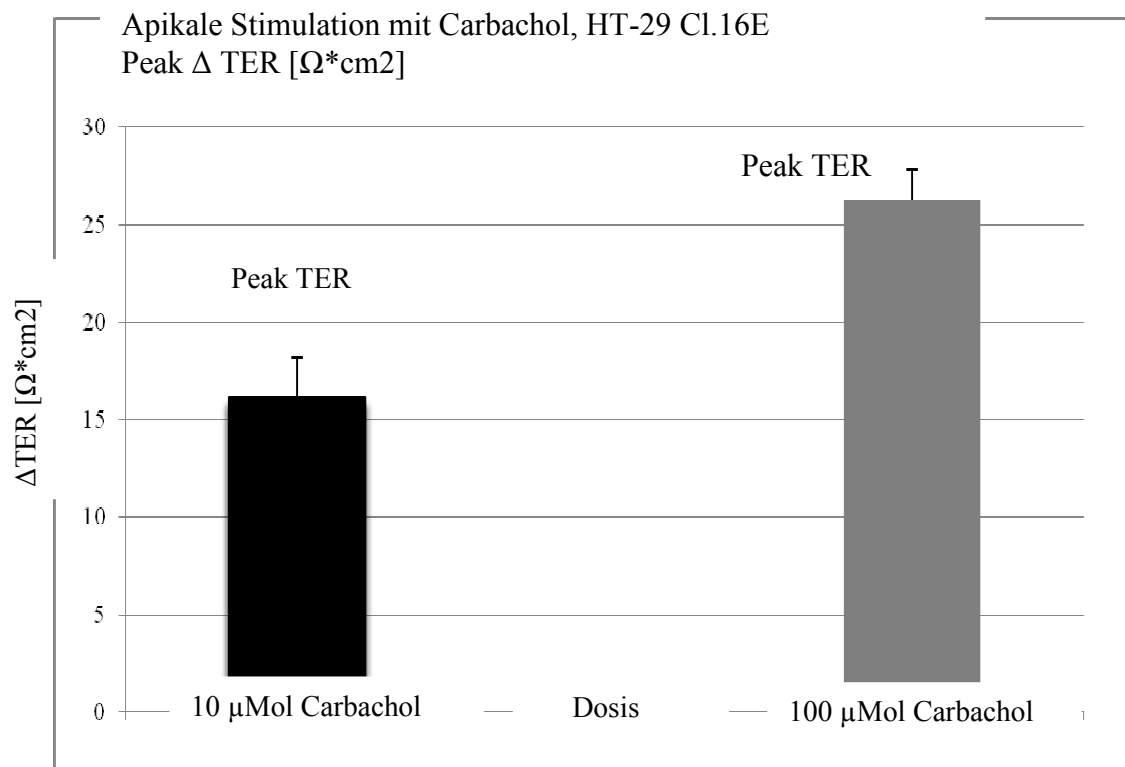


Abb. 34: Gezeigt ist der maximale Anstieg des TER nach apikaler Stimulation mit Carbachol 10 und 100  $\mu\text{Mol}$ . Mittelwerte für  $n=3$  mit SEM.

Abb. 33 und 34: Die Stimulation mit Carbachol zeigt eine dosisabhängige Erhöhung des TER sowohl an der apikalen, als auch an der basolateralen Membran. Die relative Erhöhung des transepithelialen Widerstandes bleibt dabei mindestens für weitere 30 min bestehen.

### 3.10.2. Basolaterale und apikale Stimulation mit Carbachol, T 84

a) Zeitverlauf:

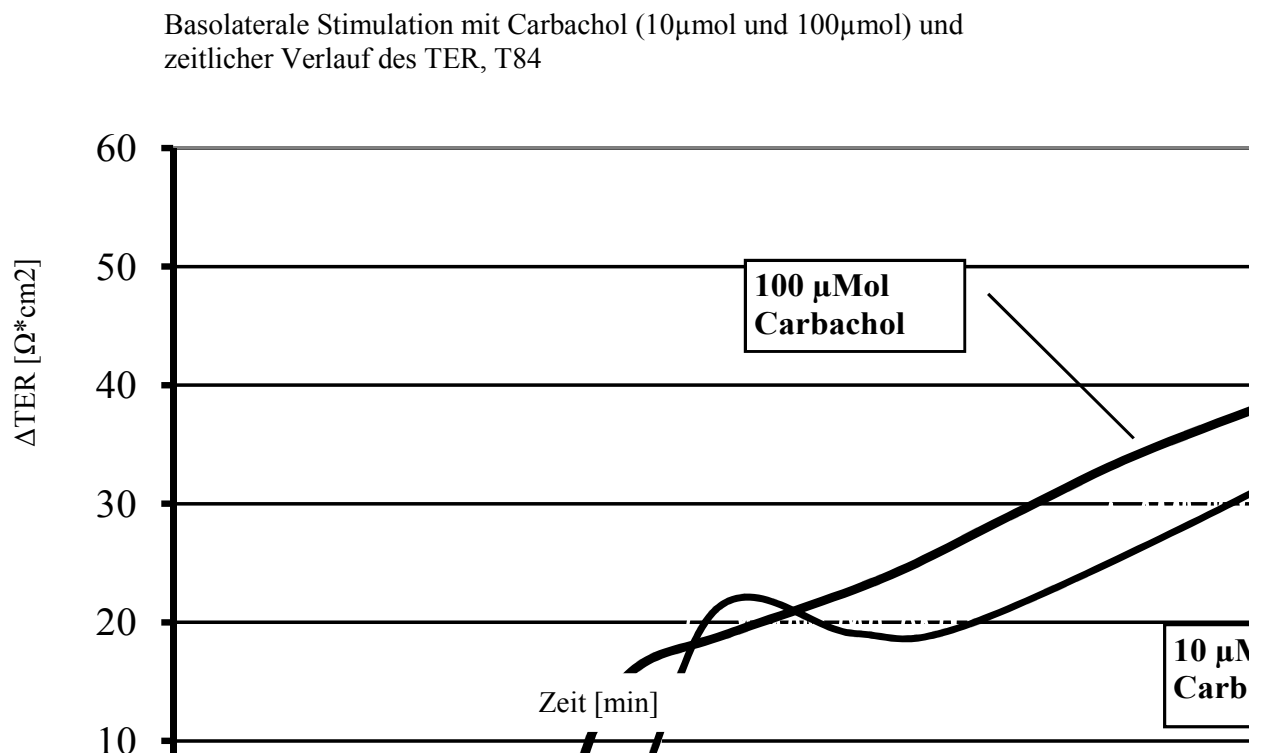


Abb. 35: basolaterale Stimulation mit Carbachol mit 10  $\mu\text{Mol}$  (zum Zeitpunkt 230min) und 100  $\mu\text{Mol}$  (233min).

Apikale Stimulation mit Carbachol (10µmol und 100µmol) und zeitlicher Verlauf des TER, T84

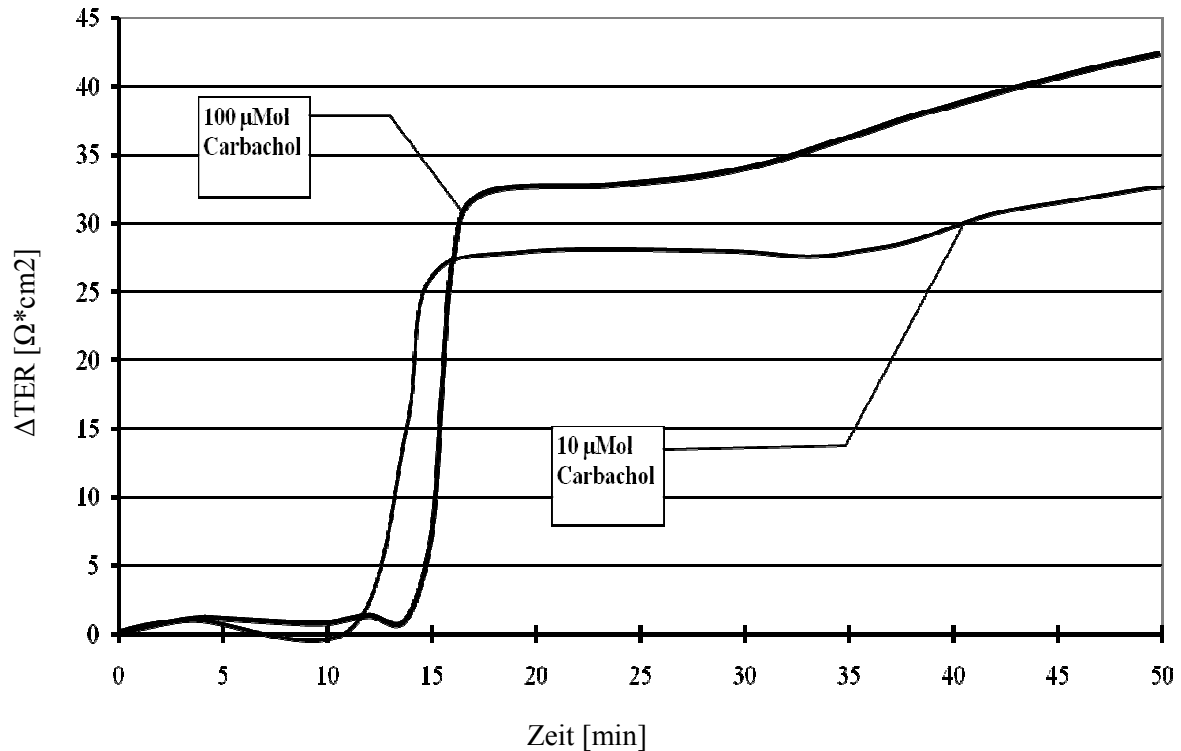


Abb. 36: T84-Zellen wurden zum Zeitpunkt 11,8 min mit 10 µMol und bei 13,3 min mit 100µMol mit Carbachol stiumliert.

Auch bei den T84-Zellen findet sich eine dosisabhängige Erhöhung des transepithelialen Widerstandes unter Carbachol. Dabei zeigt sich ein anhaltender Anstieg in der Nachbeobachtungszeit (Abb. 35). Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch unter der apikalen Gabe von Carbachol (Abb. 36). Insgesamt fällt der Anstieg des TER dabei jedoch etwas geringer aus. Auf Seite 74/75 ist der sprunghafte Anstieg kurz nach Applikation von Carbachol, getrennt nach Dosis und basolateraler/apikaler Membran, dargestellt (Abb. 37 und 38).

Abb.37:

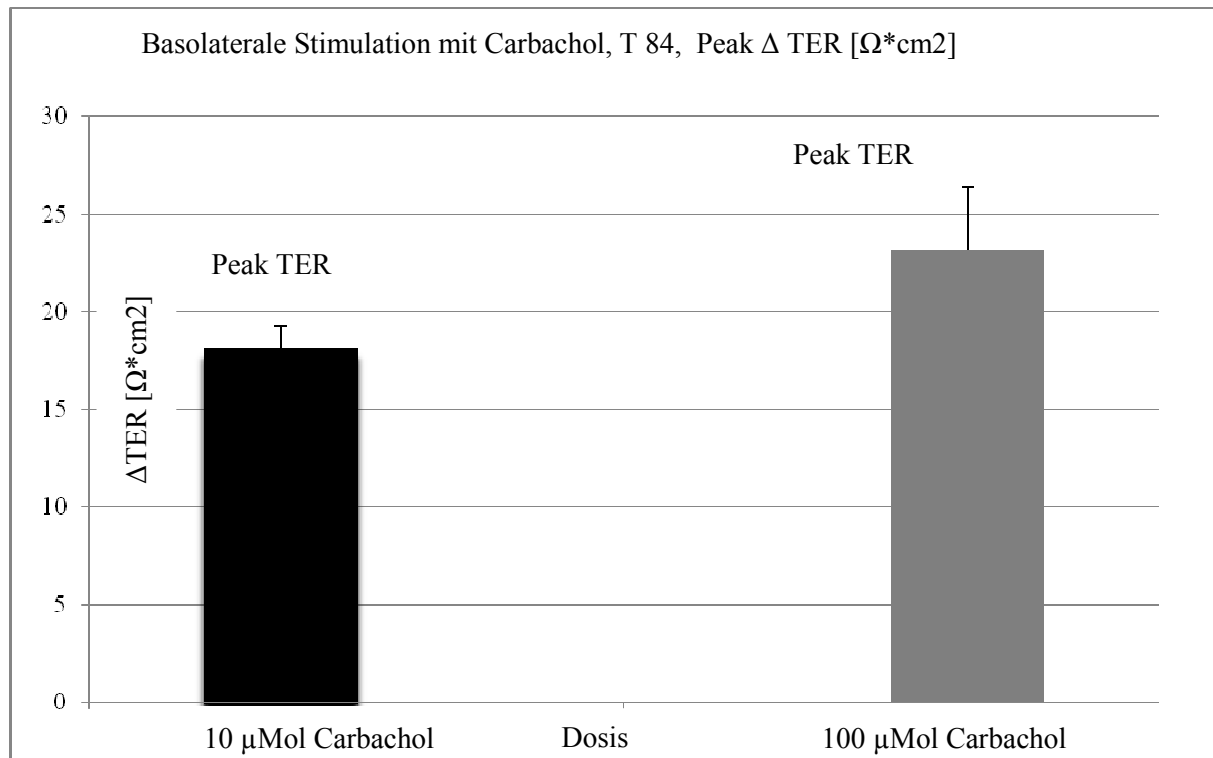


Abb. 37: Maximaler Anstieg des TER unter 10 und 100  $\mu\text{Mol}$  Carbachol nach basolateraler Stimulation (n = 3)

Abb. 38:

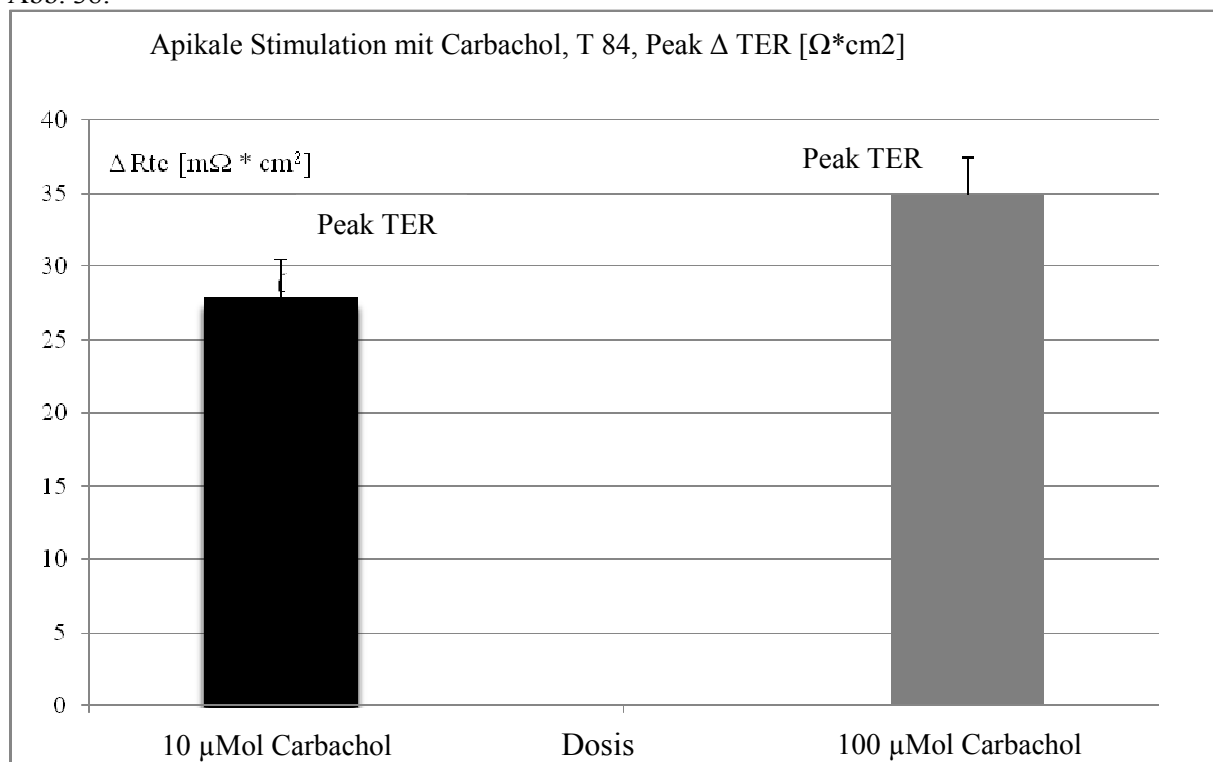


Abb. 38: Maximaler Anstieg des TER unter 10 und 100  $\mu\text{Mol}$  Carbachol nach apikaler Stimulation (n = 3)



## 4. Diskussion

Das Epithel des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) besteht aus einer kontinuierlichen Zellschicht mit polarisierten und hochspezialisierten Zellen. Im Dünndarm bekleidet diese Zellschicht die Krypten und Zotten. Im Kolon verlieren sich die Zotten, wohingegen charakteristischerweise Krypten gefunden werden.

Die lumenseitige, apikale Oberfläche des Epithels wird permanent einer enormen Anzahl verschiedenster Mikro- und Makromoleküle ausgesetzt. Diese stammen aus zahlreichen unterschiedlichen Quellen. Neben den vielfältigen körpereigenen Substanzen, die para-, auto- und exokrin aus den spezialisierten Zellen des GI-Traktes sezerniert werden (zur Spaltung und Digestion von Nahrungsbestandteilen, Immunabwehr, Regulation, usw.), kommen hier körperfremde Mikroorganismen und deren Stoffwechselmetabolite hinzu. Neben der residenten mikrobiologischen Flora des Magen-Darmtraktes, die für eine regelrechte Funktion unentbehrlich ist, sind vor allem auch die fakultativ und obligat pathogenen Keime zu berücksichtigen.

In diesem Zusammenhang sind die z.T. schützenden sekretorischen Funktionen (Wasser-, Muzin- und Ionensekretion) sowie die Regulation und Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere von besonderer Bedeutung und Gegenstand dieser Arbeit.

### 4.1 Nachweis der Chloridsekretion durch PGE<sub>2</sub> in HT-29 Cl.16E und T84-Zellen

Die Effekte der Prostaglandine in den verschiedenen Geweben und insbesondere im GI-Trakt, wurden in den vergangenen Jahren sehr gut untersucht. Die Wirkung des Prostaglandins E<sub>2</sub> wird z.B., abhängig vom Prostaglandin-Rezeptorsubtyp (EP1-EP4), ebenfalls über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt. So führt z.B. eine Bindung des PGE<sub>2</sub> an den EP3-Rezeptortyp zur Aktivierung eines stimulierenden Gs-Proteins, welches dann über die Adenylatcyclase die Konzentration an intrazellulären cAMP erhöht und hierdurch eine Chloridsekretion bewirkt (Keely SJ et al, 2009; McNamara et al, 1999; JW Peterson et al, 1989).

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die schließlich durch Phosphorylierung eine Öffnung der CFTR-Kanäle bewirkt (Vaandrager AB et al, 1997; Schwiebert EM et al, 1994; Hryciw DH et al, 2000; Barrett K. E. et al, 2000). Weitere, bisher nicht näher charakterisierte Kanäle, wie z.B. der ORCC („outwardly rectifying chloride channel“, (Schwiebert EM et al, 1994) scheinen hierbei jedoch ebenfalls involviert zu sein.

Durch die dosisabhängige Stimulation eines Kurzschlussstromes durch PGE<sub>2</sub> in den in unseren Experimenten eingesetzten HT-29 Cl.16E und T84-Zelllinien wurden indirekt funktionstüchtige Chloridkanäle nachgewiesen. Diese stellen in den gängigen Hypothesen über die unspezifischen intestinalen Abwehrmechanismen u.a. ein wesentliches Element im Sinne einer protektiven Spülfunktion dar.

In beiden Zelllinien konnte mit steigenden Konzentrationen eine Zunahme des Isc verzeichnet werden. In den HT-29 Cl.16E wurde jedoch ab einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> kein weiterer Anstieg des Kurzschlussstromes gemessen. Ursache hierfür ist vermutlich, dass bei dieser Konzentration des Agonisten alle verfügbaren Prostaglandinrezeptoren an der apikalen Membran der Zellen besetzt waren. Der halbmaximal erzielte Wert für den Kurzschlussstrom lag bei beiden Zelllinien bei 50 nM (EC<sub>50</sub>). Gezeigt wurde in dieser Versuchsreihe auch, dass PGE<sub>2</sub> unterschiedlich potent in beiden Zelllinien wirkt. In den HT-29 Cl.16E-Zellen konnte im Vergleich zu den T84-Zellen ein deutlich höherer Wert nach der Prostaglandinstimulation erzielt werden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Anzahl der exprimierten Chloridkanäle in den HT-29 Cl.16E deutlich höher ist, als in den T84-Zellen.

Parallel zu dem Anstieg des Isc konnte ein proportionaler Abfall des transepithelialen Widerstandes verzeichnet werden. Vermutlich löst die intrazelluläre Signalkaskade vermittelt über den erhöhten cAMP-Spiegel auch eine unmittelbare Konformationsänderung der Zona occludens aus.

Wissenschaftliche Belege für diese Hypothese finden sich auch in anderen Arbeiten, in denen

tatsächlich über die PGE<sub>2</sub>-Stimulation eine Erhöhung der cAMP-Spiegel induziert werden konnte, und hierdurch über weitere intrazelluläre Kaskaden u.a. eine Veränderung der Zona occludens beschrieben wurde (Rodríguez-Lagunas MJ et al, 2010; Shivanna M et al, 2010). Eine weitere Erklärung für den Abfall des TER könnte eine allgemeine Veränderung der physikalischen Eigenschaften des Epithels durch Steigerung der Leitfähigkeit infolge des begleitenden passiven Wasserausstromes sein. Letztlich wurde jedoch mit diesem Ansatz gezeigt, dass die Zellen potenziell über die Fähigkeit einer Chloridionensekretion verfügen und somit prinzipiell auch die PAR-2-Aktivierung diesen Mechanismus in Gang setzen könnte.

#### **4.2 Einfluss von Trypsin und des PAR-2 Agonisten (=AP aktivierendes Peptid) auf den transepithelialen Widerstand und Kurzschlussstrom in den Zelllinien HT-29 Cl.16E und T84**

In den HT-29 Cl.16E führte die apikale Stimulation mit Trypsin und dem PAR-2 Agonisten zu einer erheblichen Steigerung des transepithelialen Widerstandes mit einer durchschnittlichen Zunahme von 130 mΩ\*cm<sup>2</sup> für die maximale Konzentration mit 10<sup>-6</sup>. Dies entsprach einer Steigerung von etwa 87 % bezogen auf den „baseline“-Wert der Zelllinie. Dabei wurde eine dosisabhängige Steigerung des TER festgestellt. Eine vergleichbare Wirkung fand sich ebenfalls bei einer basolateralen Stimulation der Zellen. Insgesamt blieb dabei aber die Zunahme des TER bei maximaler Trypsinkonzentration mit 59 % über dem Ausgangswert hinter der Wirkung einer apikalen Stimulation.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die physiologische Verteilung der PAR-Rezeptoren in-vivo sein. Wenn man sich die physiologischen Verhältnisse im Darmlumen vergegenwärtigt, so liegt die Vermutung nahe, dass der PAR-2 wahrscheinlich in weit aus höherer Zahl im Bereich der mukosalen (= apikalen) Membran exprimiert wird. Dies könnte mit dem Vorkommen des physiologischen Agonisten des PAR-2, dem Trypsin, in Zusammenhang stehen. Auch in anderen Arbeiten konnten vergleichbare Effekte auf den transepithelialen Widerstand vermittelt über den PAR-2 beschrieben werden. So wurde in einem Versuchsansatz der Effekt von Trypsin auf die epitheliale Permeabilität bzw. TER untersucht (Swystun V et al, 2005). Das Ergebnis war hier ebenfalls ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes. Jacob C. et al konnten darüber hinaus für die Mastzelltryptase, die ebenfalls den PAR-2 zu aktivieren vermag, ähnliche Effekte auf den TER im Dickdarmepithel nachweisen (Jacob C, 2005).

Die Serumkonzentration des Trypsins ist verglichen mit den Konzentrationen anderer Proteine im Serum erheblich niedriger und selbst bei einer Stimulation mit Sekretin oder Pankreozymin nur geringfügig steigerbar (W. Bieger et al, 1982).

Im Gegensatz hierzu finden sich jedoch endoluminal, insbesondere in der postprandialen Phase, deutlich erhöhte Konzentration an Trypsin, das nun Enterozyten im Bereich der apikalen Membran stimulieren kann. Die ausgeprägte Steigerung des transepithelialen Widerstandes im Sinne einer verminderten Permeabilität könnte in diesem Zusammenhang nicht nur als rein protektive Funktion vor Mikroorganismen, sondern auch als eine Art Schutzmechanismus vor den autodigestiven Wirkungen der Verdauungsenzyme verstanden werden.

Auffällig war in diesem Versuchsansatz mit den HT-29 Cl.16E darüber hinaus der Umstand, dass äquimolare Konzentrationen von Trypsin im Vergleich zu dem PAR-2 Agonisten scheinbar weitaus potenter hinsichtlich der Erhöhung des TER waren. Um eine signifikante Steigerung des TER unter dem PAR-2 Agonisten zu erzielen, mussten erheblich gesteigerte Konzentrationen verwendet werden. Diese Diskrepanz lässt sich jedoch relativ einfach über die spezielle physiologische Aktivierung des PAR-2 erklären (siehe dazu Einleitung). Bei der Aktivierung des Rezeptors wird nämlich der gebundene Ligand durch eine Spaltung der Proteinase (in diesem Falle Trypsin) freigelegt und vermag den Rezeptor zu aktivieren. Nach diesem Schritt wird der Rezeptor internalisiert und in Lysosomen abgebaut oder durch membrangebundene Proteinasen wieder deaktiviert. Letztlich führt aber diese enzymatische Spaltung und damit Aktivierung des Rezeptors dazu, dass ein Trypsinmolekül eine unbestimmte Anzahl vieler Rezeptoren aktivieren kann. Die Aktivierung durch das synthetisch hergestellte Peptid hingegen erfolgt nur einmal pro Peptid und Rezeptor, da nach Aktivierung des Rezeptors, dieser samt Agonist in die Zelle aufgenommen und degradiert wird. In vielen anderen Arbeiten wurden bereits ausführlich die Besonderheiten der physiologischen Aktivierung der PARs charakterisiert (Al Ani B et al, 1995; Dery, O et al, 1998; Scarborough, R.M et al, 1992).

Der Kurzschlussstrom zeigte in den HT-29 Cl.16E weder bei der Stimulation mit Trypsin, noch mit dem aktivierenden Peptid eine Veränderung. Dieses Ergebnis stellt eine gewisse Besonderheit dar, da im Gegensatz hierzu in zahlreichen vorangehenden Arbeiten unter einer PAR-2-Aktivierung eine relevante Erhöhung des Kurzschlussstromes gemessen werden konnte (van der Merwe JQ et al, 2008; Kunzelmann K. et al, 2002; Mall M. et al, 2002). Einschränkend muss man jedoch erwähnen, dass in den oben aufgeführten Arbeiten die Untersuchungen nicht an der HT-29 Cl.16E-Zelllinie, sondern an anderen Zelllinien durchgeführt wurden.

Der fehlende Anstieg des Kurzschlussstromes durch eine PAR-2-Aktivierung könnte evtl. mit den besonderen Eigenschaften der HT-29 Cl.16E zusammenhängen.

Wie o.a. wurde diese Zelllinie im Jahre 1984 von Chantal Augeron and Christian L. Laboisie 1984 (C.Augeron and C. L. Laboisie, 1984) aus der ursprünglichen HT-29-Zelllinie entwickelt. Hierzu wurden die Zellen mit Natriumbutyrat behandelt. Im Verlauf jener Untersuchungen stellte man bei der Kultivierung der Zellen mit diesem Zusatz fest, dass innerhalb des gesamten Zellrasens zunächst nur einzelne Bereiche ein flaches, einschichtiges Epithel bildeten. Andere Areale des inhomogenen Zellrasens hingegen wiesen weiterhin auch unter den veränderten Kulturbedingungen alle Charakteristika der ursprünglichen HT-29-Zelllinie auf, d.h., diese Zellen blieben undifferenziert, wiesen keine Polarisierung mit Ausbildung von apikalen Muzingranula auf, und zeigten ein mehrschichtiges Wachstumsverhalten. Aus den flachen Zellarealen wurden letztlich Zellen isoliert, die vermutlich im Bereich eines „flat focus“ alle aus einem lokalen Zellklon entstanden waren, und im Verlauf auch unter Standardkultivierungsbedingungen wieder einen einschichtigen, differenzierten Zellrasen entwickelten. Letztlich konnte auf diesem Wege eine stabile Zelllinie mit besonderen histomorphologischen Merkmalen etabliert werden. Das besondere an diesem Entwicklungsprozess war jedoch die Tatsache, dass die HT-29-Kultur unter der Behandlung mit Natriumbutyrat an vielen verschiedenen Bereichen gleichzeitig „flat foci“ ausbildete. Dieser Umstand wiederum legte die Vermutung nahe, dass wahrscheinlich fast alle Zellen der HT-29-„Parentallinie“ die genetische Information zur potenziellen Differenzierung enthielten, jedoch nur bestimmte Zellen aus einer Population unter Natriumbutyrat diese Entwicklung durchmachten (C.Augeron and C. L. Laboisie, 1984).

Dieser Punkt ist nun eine bemerkenswerte Eigenschaft der Zellen insofern, dass man nicht mit absoluter Gewissheit sagen, ob diese Zellen, die aus verschiedenen Bereichen der separat entstandenen „flat foci“ isoliert wurden, alle auch eine identische Differenzierung unter dem Einfluss des Natriumbutyrats durchgemacht haben. Wahrscheinlicher ist eher die Vorstellung, dass diese Zellen zwar im Vergleich zur Ursprungslinie eine reifere Differenzierungsstufe darstellen und damit scheinbar phänotypisch gleich aussehen, aber nicht alle Zellen eine vollkommen identische Expression von Rezeptortypen auf ihre Oberfläche besitzen, sondern untereinander weiterhin eine inhomogene Kultur auf einer gemeinsamen, aber letztlich nur ähnlichen Differenzierungsstufe darstellen. So kann man auch darüber spekulieren, ob bestimmte Stoffwechselprozesse und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in allen Zellen der HT-29 Cl.16 E identisch ablaufen, oder nicht vielmehr zwar ein gemeinsamer gleicher Nenner besteht, aber durchaus Unterschiede im Phänotyp bestehen.

Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in den hier verwendeten HT-29 Cl.16E-Zelllinien bestimmte Signaltransduktionskaskaden abgeschaltet sind oder alternative Wege bestehen. Eine weitere Erklärung für den fehlenden Anstieg des Kurzschlussstromes durch eine PAR-2-Aktivierung könnte die Tatsache sein, dass in anderen Arbeiten gezeigt wurde, dass die Chloridsekretion in diesen Zellen unabhängig vom intrazellulären Calciumanstieg und von der Proteinkinase A reguliert wird (Guo X. et al, 1995; Guo X. et al, 1997). Ein intrazellulärer Calciumanstieg ist jedoch zumindest ein gesicherter Effekt durch eine PAR-2-Aktivierung (siehe Calciumphotometrie). Das eine Chloridsekretion in dieser Zelllinie möglich und durch bestimmte Agonisten auch stimulierbar ist, wurde in der Arbeit von Guo et al. gezeigt (Guo X. et al, 1995). Verwendet wurde in diesen Versuchsansätzen z.B. ATP. Inzwischen sind 3 Typen (P1-, P2- und P3-Purinorezeptoren (Bucheimer RE et al, 2003; von Kügelgen I, 2006; Shinozuka T et al, 2006) und mehrere Subtypen der Purinorezeptoren charakterisiert worden. Bei einem Großteil der ATP-vermittelten intrazellulären Signaltransduktionskaskade spielt Calcium eine Rolle. Darüber hinaus gibt es jedoch außer Calcium wahrscheinlich auch andere second messenger (Guo X. et al, 1995). Denkbar ist auch eine direkte Aktivierung der Chloridkanäle durch ATP. Möglicherweise sind Chloridkanäle,

die durch Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert werden, in den HT-29 Cl.16 E-Zellen in reduzierter Zahl vorhanden oder gar nicht exprimiert. In den T84-Zellen führte eine basolaterale Stimulation mit Trypsin und dem PAR-2 Agonisten zu einem Anstieg des Kurzschlussstromes. Dies ist gleichbedeutend mit einer durch den PAR-2 vermittelten Chloridsekretion. Dabei konnte bei steigenden Trypsindosierungen zunächst eine kontinuierliche Steigerung des Isc verzeichnet werden, jedoch fand sich dann ab einer Dosis von  $10^{-7}$  ein biphasischer Verlauf mit vergleichsweise geringerem Anstieg. Dieser Verlauf des Isc unter zunehmenden Trypsindosierungen könnte evtl. auf die allgemeinen proteolytischen Eigenschaften des Trypsins im Sinne einer Autolyse/enzymatischen Schädigung des Epithels zurückgeführt werden. Entsprechend sah man unter einer steigenden Dosierung des aktivierenden Peptids einen proportionalen Anstieg des Isc. Parallel zu dem Anstieg des Isc unter Trypsin und PAR-2 AP konnte ein Abfall des transepithelialen Widerstandes gemessen werden. Ein möglicher Anstieg des TER kann durch den gleichzeitigen Anstieg des Kurzschlussstromes jedoch auch maskiert sein. Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der PAR-2-vermittelten Regulation der parazellulären Permeabilität sind durchgeführt worden. Cenac et al. konnte z.B. zeigen, dass eine PAR-2-Stimulation am Mäusedarm eine Zunahme der parazellulären Permeabilität bewirkte (Cenac N. et al, 2004). Auch Kawabata beschrieb ähnliche Effekte im Sinne einer Zunahme der Permeabilität am Mäusedarm nach Applikation von PAR-1 und PAR-2-Agonisten (Kawabata A et al, 2001).

Nach apikaler Stimulation mit Trypsin konnte bei den T84-Zellen ebenso wie bei den HT-29-Zellen ein Anstieg des TER festgestellt werden. Dieser fiel jedoch mit etwa 44,5 % (absolut  $\Delta$  TER  $\sim 76 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) über dem baseline-Wert niedriger aus als in der HT-29 Cl.16 E-Zelllinie. Sowohl der TER, als auch der Isc blieben nach Gabe des PAR-2 Agonisten apikalseitig nahezu unverändert. Ein plausibler Grund dafür, dass die HT-29 Cl.16 E-Zellen einen weitaus höheren Anstieg des TER unter der apikalen Stimulation mit Trypsin und PAR-2 AP entwickelten, könnte damit zusammenhängen, dass die Rezeptordichte in der o.a. Zelllinie höher liegt als in den T84-Zellen. So erklärt sich evtl. der Effekt, dass vergleichsweise relativ „niedrige“ Dosierungen des aktivierenden Peptids den TER in T84-Zellen kaum beeinflusste. Die Beobachtung, dass PAR-2 AP nach apikaler Stimulation der T84-Zellen keine Veränderung bewirkt, lässt den Schluss zu, dass der PAR-2 auf der apikalen Oberfläche dieser Zelllinie nicht exprimiert wird. Interessanterweise wird jedoch ein Anstieg des TER nach Trypsin-Gabe erzielt. Kawabata konnte, wie bereits oben erwähnt, Veränderungen der epithelialen Permeabilität sowohl durch PAR-1-, als auch durch PAR-2-Stimulation hervorrufen (Kawabata A et al, 2001). Zwar handelte es sich um genau gegensinnige Veränderungen im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, aber in seinem Untersuchungsansatz wurden die Versuche direkt an speziell präpariertem Mäusedarm durchgeführt, wohingegen die hier verwendeten Zellen aus humanen, immortalisierten Kolonkarzinomzelllinien stammen. Die Frage, ob die PAR-Rezeptoren am menschlichen und am tierischen Darm grundlegend verschiedene Prozesse und Funktionen regulieren, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden.

Letztlich konnte in der o.a. Arbeit von Kawabata jedoch gezeigt werden, dass die Permeabilität bzw. der transepitheliale Widerstand im Darm nicht nur durch einen PAR-Typ reguliert wird. So muss auch vermutet werden, dass der Trypsin-induzierte Anstieg des TER bei apikaler Stimulation der T84-Zellen evtl. über einen anderen PAR-Rezeptor vermittelt wurde.

Das Ergebnis, dass eine Stimulation der apikalen Membran sowohl mit Trypsin, als auch mit PAR2 AP keine Veränderung des Isc auslöst, deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen zahlreicher anderer Arbeiten (Mall M. et al, 2002; Chin AC et al, 2008).

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der PAR-2 abhängig von der Lokalisation und Expression an ein und derselben Zelle (apikal versus basolateral) über verschiedene Signaltransduktionswege verschiedene Effekte induzieren kann. Versucht man die T84-Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse zu übertragen, könnte das zum einen bedeuten, dass der physiologische, lumenseitige Kontakt der Darmepithelien mit dem im Nahrungsbrei enthaltenen Trypsin als Normalzustand betrachtet werden kann, und deshalb keine nennenswerte Veränderung der Permeabilität und Ionensekretion verursacht („apikale Stimulation“). Kommt es aber im Rahmen physiologischer Prozesse, wie z.B. der Digestion, oder in Zusammenhang mit Zerstörungen der epithelialen Barriere, also pathophysiologischen Veränderungen zu einem signifikanten Anstieg des Serum-Spiegels des Trypsins mit konsekutiver basolateraler Stimulation der Zellen, folgt eine Ionensekretion, die als protektive Spülfunktion aufgefasst werden kann, um entweder den weiter

fortwährenden Kontakt mit dem potenziell schädigenden Trypsin zu unterbrechen oder auch invasive Pathogene „wegzuspülen“. Denkbar ist auch, dass in den unterschiedlichen und z.T. hoch-spezialisierten Abschnitten des Intestinaltraktes verschiedene Funktionen über die PAR-Stimulation reguliert werden. So könnte die Beobachtung in den HT-29 Cl.16 E-Zellen einer gleichsinnigen Erhöhung des TER sowohl bei apikaler als auch basolateraler Stimulation bedeuten, dass bestimmte Darmabschnitte vulnerabler gegenüber der potenziell autodigestiven Wirkung des Trypsins sein könnten und deshalb sowohl bei apikaler, als auch bei basolateraler Stimulation empfindlicher mit einer protektiven Erhöhung des TER reagieren.

#### **4.3 Zeitverlauf des TER-Anstiegs nach apikaler und basolateraler Stimulation unter Trypsin und PAR-2-AP in den Zelllinien HT-29 Cl.16E und T84**

Die basolaterale Gabe von Trypsin in den HT-29 Cl.16E-Zellen führte dosisabhängig zu einem langsamen Anstieg des transepithelialen Widerstandes, der nach etwa 30 min ein Maximum erreichte und zunächst auf diesem erhöhten Niveau für eine längere Zeit persistierte. Die Gabe von PAR-2 AP hingegen führte deutlich rascher zu einem Anstieg des TER mit Erreichen des Maximalwertes nach ca. 5 min. Wie bereits oben beschrieben fiel der Absolutwert des Widerstandsanstieges unter Trypsin deutlich höher aus. Die unterschiedliche Kinetik hinsichtlich der Wirkung unter Trypsin einerseits und PAR-2 AP andererseits kann auch aus der physiologischen Wirkungsweise des PAR-2 mit der Signaltransduktion und der Signalterminierung erklärt werden. Der verzögerte Anstieg des TER unter der Trypsinstimulation hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass nach Zugabe des Enzyms ins basolaterale Kompartiment das vergleichsweise hochmolekulare Protein zunächst bis an den Wirkungsort, d.h. den Rezeptor an der Membranoberfläche diffundieren muss. Nach dem das Enzym an den Zielort gelangt ist, beginnt es mit seiner proteolytischen Aktivität und spaltet Rezeptor um Rezeptor, so dass mit fortschreitender Zeit immer mehr Rezeptoren aktiviert werden, bis irgendwann sich ein Gleichgewicht aus Rezeptordegradation, Aktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms, sowie physiologische Inaktivierung des Trypsins einstellt (steady state).

Bei der Stimulation mit dem aktivierenden Peptid muss man davon ausgehen, dass auf Grund des weitaus geringeren Molgewichts innerhalb kürzester Zeit eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Kompartiment stattfindet und so sehr rasch die maximale Anzahl an Rezeptoren stimuliert werden. Dabei gilt natürlich, dass jeweils nur ein Peptid an einen Rezeptor binden kann. Nach erfolgreicher Signaltransduktion mit Initiierung der weiteren intrazellulären Prozesse wird der Rezeptor nach einer bestimmten Zeit durch einen Clathrin-vermittelten Prozess endozytiert und in Lysosomen abgebaut. Ein weiterer denkbarer Inaktivierungsweg wäre eine Spaltung des Peptids durch lokal an der Membran befindliche Peptidasen. Hieraus erklärt sich auch der relativ rasche Abfall des transepithelialen Widerstandes nach erfolgter Stimulation mit dem Peptid.

Die apikale Stimulation in der o.g. Zelllinie mit Trypsin führte ebenfalls zu einem vergleichsweise langsamen Anstieg des TER. Nach ca. 10-20 min wurde der Maximalwert erreicht. Dieses erhöhte Plateau für den TER blieb über die restliche Versuchsdauer erhalten.

Durch Stimulation mit dem aktivierenden Peptid konnte wie auch bei der basolateralen Gabe ein rascherer Anstieg verzeichnet werden. Das höchste Niveau wurde wieder nach ca. 8-10 min erreicht und zeigte im weiteren Verlauf einen sehr milden Abfall.

Im Unterschied zu der basolateralen Stimulation fand sich in diesem Versuchsansatz eine insgesamt verlängerte Wirkung nach Zugabe des Peptids. Über eine prolongierte Aktivität des PAR-2 könnte in diesem Zusammenhang spekuliert werden. Möglicherweise werden die Prozesse im Bereich der apikalen Membran, die zur Endozytose, und damit zur Inaktivierung des Rezeptors führen, langsamer in Gang gesetzt, wodurch die intrazelluläre Signaltransduktion länger aufrecht erhalten wird. Aus physiologischer Sicht kann spekuliert werden, dass auch in vivo die weitaus höheren Konzentrationen an Trypsin sich stets endoluminal (=apikal) befinden und das Epithel möglicherweise direkt über Trypsin geschädigt werden kann, so dass eine verlängerte Wirkung des PAR-2 mit einer daraus resultierenden Steigerung der tight junction-Dichtigkeit einen elementaren protektiven Faktor gegenüber den autodigestiven Eigenschaften der Verdauungsenzyme des eigenen Körpers darstellt.

In den T84-Zellen verhielten sich der transepitheliale Widerstand und der Kurzschlussstrom über die Zeit anders als in den HT-29 Cl.16E. Betrachtete man den TER, so konnte festgestellt werden, dass dieser nach Zugabe von Trypsin innerhalb kürzester Zeit einen dosisabhängigen Abfall zeigte. Dabei wurde durch die höchste Trypsindosis mit  $10^{-6}$  auch der stärkste Abfall um ca.  $56 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (entspricht etwa 32 % des baseline-Wertes) induziert. Nach 7-10 min wurde wieder der Ausgangswert erreicht. Parallel hierzu fand sich eine gegensinnige Veränderung des Isc mit einem maximalen Anstieg auf  $72 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (baseline-Isc:  $5,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) bei einer Trypsinkonzentration von  $10^{-7}$ . Bei der nächstgrößeren Konzentrationsstufe wurde ein geringerer Peak registriert. Diese Veränderung kann evtl. wieder auf eine potenzielle Schädigung des Epithels durch eine unphysiologisch hohe Trypsinkonzentration zurückgeführt werden. Auch hier wurden nach 7-10 min wieder die Ausgangswerte registriert. Vergleichbare Veränderungen des TER und Isc wurden auch bei der Stimulation mit dem PAR-2 Agonisten gemessen. Es fand sich ein Anstieg des Kurzschlussstromes mit einem begleitenden Abfall des TER. Dabei waren die gemessenen Maximalwerte mit dem PAR-2 Agonisten, wie auch bei den vorangehenden Versuchsansätzen, geringer als unter einer Trypsinstimulation.

Werden nun diese Veränderungen der Messgrößen in den T84-Zellen zusammengefasst, so kann hieraus der Schluss gezogen werden, dass die eine basolaterale Stimulation der Zellen zu einer passageren Chloridsekretion führt. Ein möglicher Anstieg des transepithelialen Widerstandes kann durch den hohen Peak des Kurzschlussstromes maskiert bleiben, jedoch wäre diese vielleicht nicht erfasste Erhöhung des TER nur eine vergleichsweise sehr kurzfristige Veränderung verglichen mit den Veränderungen in den HT-29 Cl.16E-Zellen.

#### 4.4 Veränderungen des Kurzschlussstromes

Es wurde in zahlreichen Arbeiten belegt, dass durch eine PAR-2-Aktivierung in vielen verschiedenen Zelllinien eine Chloridsekretion induziert werden kann. So wurde gezeigt, dass über eine PAR-2-Stimulation der transepitheliale Ionentransport im Pankreasgang reguliert werden kann (Nguyen TD et al, 1999). Auch die Ionentransportprozesse in den Neuronen (Green BT et al, 2000), in den kortikalen Sammelzellen der Niere (Bertog M et al, 1999) und im Jejunum und Ileum (Vergnolle N et al, 1998) können durch PAR-2-Aktivierung beeinflusst werden.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte nun einmal mehr gezeigt werden, dass auch in intestinalen Epithelzellen aus dem menschlichen Kolon Ionentransportprozesse durch den PAR-2 gesteuert werden können. Die potenzielle Stimulation eines Kurzschlussstromes, bzw. die Induktion einer Chloridsekretion in den Zellen durch Aktivierung des PAR-2 kann in vivo viele verschiedene Aufgaben erfüllen. So wurde bereits auf die protektive Spülfunktion durch die Chloridsekretion mit passivem Wasserausstrom hingewiesen. Auch eine direkte Stimulation der proteinase-aktivierten Rezeptoren im Darm durch bakterielle Enzyme ist denkbar, bzw. sogar sehr wahrscheinlich. Ein Hinweis hierfür ist z.B. die Tatsache, dass der PAR-2 durch ein Toxin des Bakteriums *Porphyromonas gingivalis*, das Gingipain-R, ebenfalls stimuliert werden kann (Lourbakos A et al, 1998). So liegt auch der Schluss nahe, dass noch weitere, bisher nicht identifizierte bakterielle Proteasen diese Rezeptorgruppe aktivieren können und hierdurch evtl. unspezifische Abwehrmaßnahmen des Epithels induziert werden.

Eine weitere Funktion der proteinase-induzierten Chlorid- und Wassersekretion könnte die Durchmischung des Chymus im Gastrointestinaltrakt mit Wasser sein. Dieser Schritt ist im Rahmen der Verdauung deshalb wichtig, weil viele Enzyme erst im flüssigen Milieu ihre volle Wirkung entfalten, die einzelnen Nahrungsbestandteile in Lösung besser erreicht werden können und die potenzielle Aufnahmekapazität der Enterozyten für die Nährstoffe u.a. vom Flüssigkeitsgehalt des Nahrungsbreis abhängig ist.

Wie aus den oben dargestellten Ergebnissen ersichtlich wird, führt die Stimulation mit Trypsin und aktivierendem Peptid in den beiden untersuchten Zelllinien zu unterschiedlichen Veränderungen des Kurzschlussstromes.

#### 4.4.1 HT-29 Cl.16E

In dieser Zelllinie konnte weder mit Trypsin, noch durch den PAR-2 Agonisten ein Kurzschlussstrom induziert werden. Auf die Besonderheiten dieser Zelllinie wurde weiter oben eingegangen. Erwähnt wurde auch, dass insbesondere bei diesen Zellen die Chloridsekretion durch einen Calcium- und Proteinkinase A-unabhängigen Prozess gesteuert wird (Guo X et al., 1995).

#### 4.4.2 T84

Die T84-Zelllinie reagierte bei der Stimulation der basolateralen Membran mit Trypsin mit einem deutlichen, biphasisch verlaufenden Anstieg des Kurzschlussstromes. Ein Erklärungsansatz für diesen biphasischen Verlauf unter Trypsin wurde im oberen Abschnitt geliefert. Ebenso konnte durch die basolaterale Gabe des aktivierenden Peptids eine Ionensekretion ausgelöst werden. Zu welchem Zweck eine Chloridsekretion dient, die durch eine basolaterale Stimulation hervorgerufen wird, ist vielleicht durch folgende Hypothese erklärbar. Postprandial führen die im Nahrungsbrei enthaltenen Aminosäuren und Fette an den enteroendokrinen Zellen im Duodenum und Jejunum zur Ausschüttung von Pankreozymin in den Blutkreislauf. Dieses Peptidhormon regt nun das Pankreas zur Sekretion der Verdauungsenzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Lipase, etc.) an. Letztlich wird somit nahrungsabhängig die Abgabe der Verdauungsenzyme in das Darmlumen reguliert. Gleichzeitig ist aber bei diesem Vorgang auch ein wahrnehmbarer Anstieg der Serumtrypsinkonzentration zu verzeichnen (W. Bieger et al, 1982). Die basolaterale Membran befindet sich in vivo auf der Blutseite der Enterozyten, so dass ein postprandialer Anstieg der Trypsinkonzentration im Serum hierüber eine direkte Stimulation auslösen kann, und als Reaktion hierauf eine Chlorid- und Wassersekretion ausgelöst wird. Dieser Vorgang kann sowohl als Selbstschutz des Körpers vor einer möglichen Autodigestion verstanden werden. Darüber hinaus ist eine ausreichende Durchmischung des Nahrungsbreis wie bereits erwähnt ebenfalls ein wichtiger Zwischenschritt vor der Verdauung und Resorption der Nahrung.

### 4.5 Veränderungen des transepithelialen Widerstandes und des Kurzschlussstromes unter Carbachol

Analog zu den Versuchen mit Trypsin und aktivierendem Peptid wurden die Veränderungen des transepithelialen Widerstandes und des Kurzschlussstromes in beiden Zelllinien nach apikaler und basolateraler Stimulation mit Carbachol beobachtet.

Hierbei zeigte sich, dass sowohl durch eine basolaterale, als auch eine apikale Stimulation mit dem Parasympathomimetikum ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes erzeugt werden konnte. Diese Veränderungen konnten in beiden Zelllinien beobachtet werden.

Die potentere Wirkungsentfaltung wurde bei einer basolateralen Stimulation erreicht. Im direkten Vergleich mit der apikalen Stimulation wurde bei basolateraler Gabe ein um  $10 \text{ m}\Omega/\text{cm}^2$  höherer Anstieg des TER verzeichnet. Diese Beobachtung konnte für beide Zelllinien (T84 und HT-29 Cl.16E) gemacht werden.

In Zusammenschau der Befunde kann hieraus der Schluss gefolgert werden, dass eine cholinerge Stimulation des intestinalen Epithels wahrscheinlich auch zu einem leichten Anstieg des TER führt. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege hierbei letztendlich beteiligt sind, muss in Zukunft noch weiter untersucht werden. Die grundsätzliche Wirkungsweise des Carbachols kann nachfolgend skizziert werden.

Carbachol ist ein direktes Parasympathomimetikum am Acetylcholinrezeptor. D.h., dass es anstelle von Acetylcholin direkt den Rezeptor aktivieren kann und im Gegensatz zum Acetylcholin durch Cholinesterasen deutlich langsamer abgebaut wird. Aktiviert werden durch Carbachol überwiegend die muskarinergen Cholinorezeptoren (M1-M5), jedoch auch zu einem geringen Teil die an den vegetativen Ganglien und an der Skelettmuskulatur befindlichen nikotinergen Rezeptoren. Eine genaue Zuordnung der Subtypen der Muskarinrezeptoren zu verschiedenen Geweben und Zellen ist gegenwärtig nur teilweise möglich. Außerdem exprimieren viele Gewebe gleichzeitig verschiedene

Subtypen. Letztlich kann man vermuten, dass die Hauptwirkung am Gastrointestinaltrakt durch M2- und M3-Rezeptoren vermittelt werden (Brown JH & Taylor P, 2001).

Acetylcholinrezeptoren sind ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über second messenger diverse intrazelluläre Prozesse regulieren (Masaru Ishii et al, 2006). Letztlich sind viele verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden nach Stimulation der muskarinergen Rezeptortypen charakterisiert worden (International Union of Pharmacology, 1998). Hierzu gehören z.B. die Inhibition des cAMP-Spiegels, die direkte Aktivierung besonderer Kaliumkanäle und auch die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels.

Die Effekte, die in Form eines Anstiegs des TER an beiden Zelllinien in dieser Arbeit beobachtet wurden, sind wahrscheinlich auf ein komplexes Zusammenspiel der oben genannten unterschiedlichen Signaltransduktionswege an den Kolonkarzinomzelllinien zurückzuführen. Vorausgesetzt, dass sich auf der Oberfläche der beiden Zelllinien hauptsächlich M2- und M3-Muskarinrezeptoren befinden, führt wahrscheinlich eine Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels, sowie die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstandes. Aus physiologischer Sicht würde eine cholinerge Stimulation, die zu einem Anstieg des TER am intestinalen Epithel führt, Sinn machen. Die erhöhte Parasympathikusaktivität am GI-Trakt hat bekanntermaßen zur Folge, dass neben einer verstärkten Motilität und Propulsion vermehrt Verdauungssäfte produziert werden. In der Gesamtheit stellen diese Veränderungen jedoch eine vermehrte mechanische und chemische Beanspruchung für das intestinale Epithel dar, so dass zusätzliche Stabilität durch eine gesteigerte tight junction-Dichtigkeit erzeugt wird.

Vergleicht man Ergebnisse aus anderen Arbeiten mit diesen Beobachtungen, so finden sich z.B. bei Barrett et al. (Kim E. Barrett et al, 1998) ähnliche Effekte bei der Stimulation intestinaler Epithelzellen mit Carbachol. So wurde bei der o.g. Arbeit die Regulation der Calcium-abhängigen Chloridsekretion in T84-Zellen untersucht. Hier konnte ebenfalls eine Inhibition der Chloridsekretion nach Carbachol-Stimulation beobachtet werden.

#### **4.6 Regulation der epithelialen Ionensekretion und des transepithelialen Widerstandes in vitro und in vivo durch PAR-2**

Das Darmepithel stellt die größte Schleimhautoberfläche des menschlichen Körpers dar und fungiert hierbei gleichzeitig als eine hochaktive Schnittstelle zwischen Umwelt und Organismus. Die Durchlässigkeit, bzw. die Intaktheit dieser epithelialen Barriere, die jedoch gleichzeitig stets als eine dynamische und hochflexible Eigenschaft angesehen werden muss, ist für eine einwandfreie Funktion des gesamten Körpers essentiell. In diesem Zusammenhang ist die komplexe Regulation der tight junction, die derzeit als ein wesentliches histomorphologisches Element der Interzellularverbindung angesehen wird, für das bessere Verständnis aller physiologischen und auch pathologischen Zustände von entscheidender Bedeutung. Viele Proteine, die am Aufbau und an der Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett beteiligt sind, wurden in den vergangenen Jahren charakterisiert. Unter diesen Komponenten befinden sich, neben dem Occludin (Furuse et al, 1993) weitere Proteine, wie z.B. die große Familie der Claudine, die ZO-Proteine (mit den Okkludinen assoziierende intrazelluläre Membranproteine), Cingulin, Fodrin, Symplekin, usw. (Alessio Fasano et al, 2008). In welcher Weise Art und Weise all diese Proteine an der gemeinschaftlichen Regulation und Aufrechterhaltung der tight junction beteiligt sind, ist nach wie vor im Detail nicht vollständig verstanden. Klar ist jedoch, dass ein tieferes Verständnis für diese Mechanismen in Zukunft sicherlich gute Ansatzpunkte für eine pharmakologische Therapie bei zahlreichen Erkrankungen liefern können (Shaun R et al, 2003).

Durch den Nachweis, dass sowohl über Trypsin, aber vor allem auch durch das aktivierende Peptid eine Steigerung des transepithelialen Widerstandes hervorgerufen wurde, kann auf eine PAR-2-induzierte Zunahme der tight junction-Dichtigkeit im Epithelverband geschlossen werden. Wie in der



Einleitung schon beschrieben wurde, führt eine Aktivierung des PAR-2 u.a. als ein möglicher Weg der intrazellulären Signaltransduktion zu einer Bildung eines hochmolekularen Komplexes, bestehend aus dem PAR-2,  $\beta$ -Arrestin, raf-1 und aktiviertem ERK1/2. Aus anderen Arbeiten konnten ergänzende Hinweise gewonnen werden, dass eine Aktivierung des ERK1/2 ebenfalls an der Regulation der tight junctions beteiligt ist (Jeannette E et al, 2009). Dies könnte evtl. ein intrazellulärer Signalweg für die Regulation der tight junctions über die Aktivierung des PAR-2 sein.

Darüber hinaus wird durch den PAR-2 eine weitere elementare Aufgabe des intestinalen Epithels mit reguliert: die Chloridsekretion. In den T84-Zellen konnte durch die basolaterale Stimulation mit dem spezifischen PAR-2 Agonisten ein signifikanter Kurzschlussstrom induziert werden. Dieser Mechanismus kann als Spülfunktion verstanden werden um Noxen und schädliche Mikroorganismen vom Organismus fernzuhalten. Andererseits kann dieser Vorgang auch als relevanter Teilschritt im Rahmen der Verdauung und Digestion aufgefasst werden.

Eine Regulation der Tight Junction im Sinne einer reduzierten Durchlässigkeit wurde bislang nur für Steroide und für IL-17 beschrieben (Kinugasa T et al, 2000; Michel A et al, 2006; Israel EJ et al, 1991, Spitz J et al, 1994), proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  führen dagegen zu einer erhöhten Durchlässigkeit (Gitter AH et al, 2000; Maren Amasheh et al, 2009). Die Aktivierung von PAR-2 auf intestinalen Epithelzellen stellt somit ein protektives Prinzip dar. Weitere Belege für eine protektive Funktion des PAR-2-Rezeptors im Magen-Darm-Trakt fanden sich ebenfalls in der Arbeit von N.Cenac (Cenac N et al, 2004).

#### **4.7 Zusammenfassung**

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung der äußerst komplexen und vielseitigen Wirkungen, die durch den PAR-2 im Gastrointestinaltrakt vermittelt werden. Hier wurde vor allem der regulatorische Einfluss des PAR-2 (Protease aktivierter Rezeptor 2) auf die intestinale Ionensekretion und die Permeabilität im unteren Intestinaltrakt untersucht.

Die Ausbildung der inneren intestinalen Barriere ist zu einem bedeutenden Anteil von Proteasen abhängig. Entscheidend im Prozess einer regelhaften Reifung und Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen ist nach Bacher jedoch vor allem der andauernde, intraluminal (apikale) Einfluss der Proteasen (Bacher A et al, 1992).

Im Hinblick auf die Tatsache, dass eine Inhibition der Proteasen intraluminal eine verminderte Bildung eines transepithelialen Widerstandes (TER) zur Folge hat (Bacher A et al, 1992), sind hier die kurzfristigen Veränderungen des TER und des Kurzschlussstromes durch Trypsin und das PAR-2-AP untersucht worden. Hinweise auf eine evtl. protektive Funktion i.S. einer Steigerung des transepithelialen Widerstandes durch Proteasen erhielt man durch die Arbeiten von Lynch (Lynch RD et al, 1995), der zeigen konnte, dass durch eine basolaterale Stimulation von Zellen mittels Trypsin tight-junction-Komplexe (vor allem ZO-1-Proteine) neu formiert werden. Über welche Rezeptoren dieser Vorgang reguliert wird, wurde in der damaligen Arbeit nicht untersucht. Entscheidend war, dass eine basolaterale Stimulation zu einem ca. 1 stündigen Anstieg des TER (transepithelialen Widerstandes) auf über 190% des Ausgangswertes geführt hatte.

In der nun vorliegenden Arbeit konnte durch die Versuchsreihe mit der Protease Trypsin und dem PAR-2-aktivierenden Peptid der Mechanismus der kurzfristig adaptiven (und vielleicht auch der permanenten) Vorgänge der tight-junction-Regulation an den Darmepithelien noch ein wenig besser charakterisiert und verstanden werden. Ein wichtiger Kandidat für diese Rezeptoren, die an der Regulation der hochkomplexen Organisation der Interzellularbrücken beteiligt sind, könnte tatsächlich der PAR-2 sein. Dass es sich bei den gezeigten Veränderungen des transepithelialen Widerstandes

nicht nur um unspezifische Effekte des Trypsins über diverse andere Rezeptoren an Darmepithelien handelt, sondern tatsächlich PAR-2 vermittelte Wirkungen vorliegen, konnte schließlich dadurch bewiesen werden, dass gleichsinnige Effekte in der gleichen Versuchsreihe durch das aktivierende Peptid mit der spezifischen Aminosäuresequenz erzielt wurden. Zwar blieb die Effektivität des PAR-2-AP deutlich hinter der des Trypsins zurück, jedoch ist dieses Phänomen durch den besonderen Rezeptoraktivierungsmechanismus der PARs erklärt (ein Molekül Trypsin vermag mehrere PARs in Serie zu aktivieren, wohingegen ein PAR-2-aktivierendes Peptid jeweils nur einen Rezeptor aktiviert und dann internalisiert wird). Die Erkenntnis, dass körpereigene Proteasen die Permeabilität des Gastrointestinaltraktes beeinflussen können und dass es sich beim transepithelialen Widerstand eher um eine dynamische, und nicht um eine statische Eigenschaft des Intestinums handelt, bietet neben der genaueren Sichtweise und dem besserem Verständnis, auch einen potenziellen pharmakologischen Ansatzpunkt in der Medizin.

Von Interesse wären hier z.B. Krankheitsbilder, die durch eine gesteigerte Permeabilität der intestinalen Barriere entweder die Ursache oder auch die unmittelbare Folge einer Erkrankung darstellen, und so zu einer weiteren Zustandsverschlechterung des Organismus beitragen können.

In diesem Zusammenhang sind die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von Interesse, bei denen eine erhöhte Permeabilität nachgewiesen werden kann.

Genauso wäre es z.B. denkbar, dass bei akuten Darminfektionen eine Keiminvasion in den Organismus therapeutisch durch Erhöhung des transepithelialen Widerstandes vermindert werden könnte. Durch Entwicklung von geeigneten Agonisten in der Zukunft könnten hier beispielsweise supportive Medikamente entwickelt werden.

## 5. Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- Al Ani B et al., 1995 Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 73
- Al-Ani B., PAR-2: role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation . *Br J Pharmacol* 128: 1105-1113, 1999
- Alessio Fasano et al., The Role of the Intestinal Barrier Function in the Pathogenesis of Celiac Disease, *Pediatr Adolesc Med. Basel, Karger*, 2008, vol 12, pp 89–98)
- Alm et al., Extrapancratic Trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 77-83, 2000
- Altieri DC et al., Proteases and protease receptors in modulation of leukocyte effector functions. *J Leukoc Biol* 58, 1995
- Andersen H et al., 1999 Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW 1999 Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Andrade-Gordon et al., Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12257-12262, 1999 *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:193-203.
- Asokanathan N et al., 2002 Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E<sub>2</sub> release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168:3577–3585
- Bacher A, Griegl K, Mackamul S, Mitreiter R, Mückter H, Ben-Shaul Y. Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines. *Exp Cell Res.* 1992 May;200(1):97-104.
- Barrett K. E. et al., 2000 Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62, 535-572
- Barrett KE et al., Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells *Am J Physiol.* 1993
- Bar-Shavit R et al., Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin, *Science.* 1983 May 13;220 (4598):728-31
- Basavappa S et al., Chloride channels in the small intestinal cell line IEC-18. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):21-31
- Belham CM et al., Trypsin stimulates proteinase activated receptor-2-dependent and independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 320: 939-946, 1996

- Berger H. A et al., 1993 Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268, 2037-2047
- Berger P et al., Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 1372-1379, 2001
- Bertog M et al., Basolateral proteinase-activated receptor (PAR-2) induces chloride secretion in M-1 mouse renal cortical collecting duct cells, *J Physiol.* 1999 Nov 15;521 Pt 1:3-17
- Biedermann T et al., Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med.* 2000
- Bizios R et al., Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils, *J Cell Physiol.* 1986 Sep;128(3):485-90
- Bleich M., The very small-conductance K<sup>+</sup> channel KvLQT1 and epithelial function, *Pflugers Arch* 4402, 202-206, 2000
- Böhm SK et al., Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2, *Biochem J.* 1996 Mar 15;314 ( Pt 3):1009-16.
- Böhm SK et al., Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less GC-rich sequence characteristic of a housekeeping gene promoter, *Biochem J.* 1995 Nov 1;311 ( Pt 3):835-43.
- Böhm SK et al., Mechanisms of desensitization and desensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol. Chem* 271: 22003-22016, 1996
- Böhm SK, et al.: Regulatory mechanisms that modulate signaling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322: 1-18, 1997
- Brass LF et al., 1992 Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem* 267:13795–13798
- Bretschneider et al., Evidence for PAR-2-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 126: 1735-1740, 1999.
- Brown JH & Taylor P: Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists.
- Brown JK et al., Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995
- Brown JK et al., Tryptase-induced mitogenesis in airway smooth muscle cells. Potency, mechanisms, and interactions with other mast cell mediators. *Chest*, 1995
- BS Mitchell et al., Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice, *The Histochemical Journal*, Volume 29, Number 5 / Mai 1997
- Bucheimer RE, Linden J., Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol.* 2004 Mar 1;555(Pt 2): 311-21. Epub 2003 Dec 23
- Buresi MC et al., Protease-activated receptor-1 stimulates Ca<sup>2+</sup> dependent Cl<sup>-</sup> secretion in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001

Buresi MC, Buret AG, Hollenberg MD, MacNaughton WK. Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclooxygenase-dependent pathway. *FASEB J*. 2002 Oct;16(12):1515-25.

C. T. Esmon et al., Inflammation and thrombosis, *Journal of Thrombosis and*, Sept 2005  
Camerer E. et al., Tissue factor and factor X-dependent activation of protease-activated receptor-2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5255-5260, 2000

Carmeliet P et al., 2001 *Biomedicine*. Clotting factors build blood vessels. *Science*; Griffin CT et al., A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*, 2001

Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, and Vergnolle N. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1903-15.

Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, and Bueno L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4296-300.

Cenac N. et al. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 2004; 558: 913-925.

Chambers LS et al., Functional effects of protease-activated receptor-2 stimulation on human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1369–L1378, 2001

Chambers RC et al., Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor, 1998

Chantal Augeron and Christian L. Labois, Emergence of Permanently Differentiated Cell Clones in a Human ColonieCancer Cell Line in Culture after Treatment with Sodium Butyrate, *Cancer Research* 44, 3961-3969, September 1984

Chen et al., Mitogenicity of thrombin and surface alterations on mouse splenocytes., *Exp Cell Res*. 1976 Aug;101(1):41-6

Chen LB, Buchanan JM., Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jan;72(1):131-5

Chi L et al., 2001 Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Interferon Cytokine Res* 21:231–240

Chin AC et al., 2003 Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*

Chin AC et al., Neutrophil-mediated activation of epithelial proteinase-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol*. 2008 Oct 15, 181 (8) : 5702-10

Chin AC et al., 2003 Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001

- Chung AW et al., 2002 Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol* 135:1123–1132
- Cicala C et al., 2001 Protective effect of a PAR2-activating peptide on histamine-induced bronchoconstriction in guinea-pig. *Br J Pharmacol* 132: 1229–1234
- Cirino G et al., 2000 Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends Pharmacol Sci.*
- Cocks TM et al., 1999 A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* 398: 156–160
- Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD and Selemidis S Protease-activated receptors
- Colotta F et al., 1994 Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol*
- Compton SJ et al., 2002 Restricted ability of human mast cell tryptase to activate proteinase-activated receptor-2 in rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol*
- Compton SJ et al., 2001 Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br J Pharmacol*
- Cook JJ et al., 1995 An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the African green monkey. *Circulation*
- Corvea CU et al., Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 1997, 100:1383–13893
- Corvera CU et al., 1997 Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 100:1383–1393
- Coughlin SR et al., Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost*, 2001
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258-264, 2000
- Covic L et al., 2002 Role of the PAR4 thrombin receptor in stabilizing platelet-platelet aggregates as revealed by a patient with Hermansky-Pudlak syndrome. *Thromb Haemost* 87:722–727
- Cuffe JE, Bertog M, Velazquez-Rocha S, Dery O, Bunnett N, and Korbmayer C. Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na<sub>+</sub> absorption in the mouse distal colon. *J Physiol* 539: 209–222, 2002.
- Cunningham MA et al., 2000 Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 115
- Nystedt S et al., 1995, The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem*
- Cupit et al., Proteolytically activated receptor-3. A member of an emerging gene family of protease receptors expressed on vascular endothelial cells and platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Jan-Feb;9(1-2):42-8. Review.1999
- D'Andrea MR et al., 2000 Localization of protease-activated receptors-1 and -2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. *Biotech Histochem*

- Davey MG, Lüscher EF, Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets, *Nature*. 1967 Dec 2;216(5118):857-8
- de Garavilla L et al., 2001 Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol*
- DeFea KA et al., Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148: 1267-1281. 2000
- Dery, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M. & Bunnett, N.W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.*, 274, 1429 ± 1452. (1998).
- Dharmasathaphorn K, et al. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 246: G204-G208, 1984
- Dieckgraefe BK, Stenson WF, Alpers DH: Gastrointestinal epithelial response to injury. *Curr Opin Gastroenterol* 12:109-114, 1996
- Dulon S. et al., Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells, disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 339-346, 2003
- E. Cario- Innate Defense Mechanisms and Survival Strategies of the Intestinal Epithelium Against Luminal Pathogens, *Z Gastroenterol* 2002; 40: 983-990
- Ecke D et al., 1996 Crypt base cells show forskolin-induced Cl<sup>-</sup> secretion but no cation inward conductance. *Pflugers Arch.* 4313, 427-434
- Engle E, Guth PH, Nishizaki Y, Kaunitz JD: Barrier function of gastric mucus gel. *Am J Physiol* 269: G994-999, 1995
- Ferrell WR et al., 2003 Essential role for proteinaseactivated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest* 111:35–41
- Fiorucci S et al., 2001 Proteinaseactivated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13936–13941
- Fitzgerald M. et al., Acid modulation of HT29 cell growth and differentiation, *Journal of Cell Science* 110, 663-671, 1997
- Fogh, J. and G. Trempe. New human tumor cell lines. In: Fogh, J., ed. *Human tumor cell lines in vitro*. New York: Plenum Press. 1975
- Frungeri MB et al., 2002 Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR<sub>γ</sub>: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Furuse et al., Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions., *J Cell Biol.* 1993 Dec;123 (6 Pt 2):1777-88)
- Garcia JG et al., Thrombin receptor activating peptides induce Ca<sup>2+</sup> mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and plateletderived growth factor mRNA expression in cultured endothelium *J Cell Physiol*, 1993
- Gerszten RE et al., Specificity of the Thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature* 368: 648-651, 1994

Giacaman RA et al., Cleavage of protease-activated receptors on an immortalized oral epithelial cell line by *Porphyromonas gingivalis* gingipains, *Microbiology*. 2009 Oct;155(Pt 10):3238-46. Epub 2009 Jul 16

Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:193-203

Green BT, Intestinal type 2 proteinase-activated receptors: expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport, *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Oct;295(1):410-6

Greger, R. 2000 Role of CFTR in the Colon. *Annu Rev Physiol* 62, 467-491

Grune and Stratton, New York. 1977

Grynkiewicz Get al., A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50

Guo X. et al., Pharmacological evidence that calcium is not required for P2-receptor-stimulated  $\text{Cl}^-$  secretion in HT29-Cl.16E., *J. Membr. Biol*. 155: 239–246, 1997

Guo X. et al., Stimulation of  $\text{Cl}_2$  secretion by extracellular ATP does not depend on increased cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in HT-29-Cl.16E. *Am. J. Physiol*. 269 (Cell Physiol. 38): C1457–C1463, 1995

Halm DR, Halm ST. Prostanoids stimulate K secretion and  $\text{Cl}$  secretion in guinea pig distal colon via distinct pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 (4): G984–G996.2001.

Hamilton J. R. et al., *J. thromb. Haemost.*, 2004; Lindner JR et al., *J Immunol.*, 2000 Dec

Hattori R et al., Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140, *J Biol Chem*. 1989 May 15;264(14):7768-71

Henriksen RA et al., 2002 PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*

Hollenberg MD et al., 1992 Action of thrombin receptor polypeptide in gastric smooth muscle: identification of a core pentapeptide retaining full thrombin- mimetic intrinsic activity. *Mol Pharmacol*

Hollenberg MD et al., Proteinase activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 832-841, 1997

Hoogerwerf WA et al., 2001 The proteinase- activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci* 21:9036–9042

Hou L et al., 1998 The proteaseactivated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells. *Br J Haematol*

Howells GL et al., 1997 Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci*

Hryciw DH, Guggino WB, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells, *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Nov;27(11):892-5



- Hung DT et al., 1992 Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest* 89:1350–1353
- Hwa JJ et al., 1996 Evidence for the presence of a proteinase activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res*
- Hwa JJ et al., 1996 Evidence for the presence of a proteinaseactivated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res*
- JG Hardman, LE Limbrid & AG Gilman, eds, In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 10. Edition: pp 155-173, 2001
- Ishihara H et al., 1997 Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502–506
- Ishihara H et al., 1998 Antibodies to protease-activated receptor 3 inhibit activation of mouse platelets by thrombin. *Blood* 91:4152–4157
- Ishihara H et al., Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506, 1997
- Ishii K et al., Kinetics of thrombin receptor cleavage o intact cells. Relation to signaling. *J Biol Chem* 268: 9780-9786, 1993
- Israel EJ, Schiffrin EJ, Carter EA, Frieberg E, Walker WA. Cortisone strengthens the intestinal mucosal barrier in a rodent necrotizing enterocolitis model. *Adv Exp Med Biol.* 1991;310:375-80.
- Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31936-48. Epub 2005 Jul 18.
- Jeannette E. Gonzalez et al., Remodeling of the tight junction during recovery from exposure to hydrogen peroxide in kidney epithelial cells, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 47, Issue 11, 1 December 2009, Pages 1561-1569
- Jilling T. et al., Cyclic AMP and Chloride-dependent Regulation of the Apical Constitutive Secretory Pathway in Colonic Epithelial Cells, *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):4381-7)
- Johansson C and Kollberg B. Stimulation by intragastrically administered E2 prostaglandins of human gastric mucus output. *Eur J Pharmacol* 9:229–232.1979.
- Johansson C, Aly A, Befrits R, Smedfors B, Uribe A. Protection of the gastroduodenal mucosa by prostaglandins. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1985;110:41-8. Review.
- Joiner WJ et al., (1997). "hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (20): 11013-8
- JW Peterson et al., Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin, *Science*, Vol 245, Issue 4920, 857-859, 1989
- Kahn ML et al., 1998 A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690–694
- Kahn ML et al., A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.*;394(6694):690-4.. 1998 Aug 13

- Kahn ML et al., Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family, *J Biol Chem*. 1998 Sep 4;273(36):23290-6
- Kameda H et al., 1997 Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin. *Br J Haematol* 97:348–355
- Kanke T. et al., PAR-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem* 18: 18, 2001
- Kaplanski G et al., 1997 Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF- $\alpha$ -independent IL-8 secretion and E-selectin expression. *J Immunol*
- Karaki Si. Et al., Regulation of intestinal secretion involved in the interaction between neurotransmitters and prostaglandin E2, *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:96-9. Review
- Katona G. et al., Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J Mol Biol*: 1209-1218, 2002
- Kauffmann HF et al., Protease dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1185-1193, 2000
- Kawabata A et al., 2001 In vivo evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse. *Br J Pharmacol*
- Kawabata A et al., 1999 Physiology of protease-activated receptors (PARs): involvement of PARs in digestive functions. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 114(Suppl 1))
- Kawabata A et al., 2000 Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion in vivo in rats and mice. *Br J Pharmacol* 129:1808–1814
- Kawabata A et al., 2001 The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest* 107:1443–1450
- Kawabata A, Kuroda R, Nishikawa H and Kawai K, Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation., *Br J Pharmacol*. 1999 Oct;128(4):865-72.
- Keely SJ et al., Regulation of chloride secretion. Novel pathways and messengers. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:67-76
- Kim E. Barrett, Jane Smitham, Alexis Traynor-Kaplan and Jorge M. Uribe. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cells: membrane target(s) of inhibition is agonist specific *Am J Physiol Cell Physiol* 274:C958-C965, 1998.
- Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1001-11.
- Koivunen et al., Human ovarian tumor-associated trypsin. Its purification and characterization from mucinous cyst fluid and identification as an activator of pro-urokinase. *J Biol Chem* 264: 14095-14099, 1989
- Komuro T et al., 1997 ,The involvement of a novel mechanism distinct from the thrombin receptor in the vasocontraction induced by trypsin. *Br J Pharmacol*
- Kong W, Böhm SK et al., 1997 Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8884–8889

Konturek SJ, Robert A, Hanchar AJ, and Nezamis JE. Comparison of prostacyclin and prostaglandin E2 on gastric acid secretion, gastrin release, and mucosal blood flow in dogs. *Dig Dis Sci* 25:673–679. 1980

Koshikawa N et al., 1997 Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett*

Koshikawa N et al., Expression of Trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol* 153: 937-944, 1998

Ku DD et al., Mechanism of thrombin-induced endothelium dependent coronary vasodilation in dogs: role of its proteolytic enzymatic activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1986

Kunzelmann K. et al., Ion transport induced by proteinase-activated receptors (PAR-2) in colon and airways. *Cell Biochem Biophys*. 2002; 36(2-3): 209-14

Lan RS et al., 2000 Modulation of airway smooth muscle tone by protease activated receptor-1, -2, -3 and -4 in trachea isolated from influenza A virus-infected mice. *Br J Pharmacol* 129: 63–70

Lan RS et al., 2001 Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol* 132:93–100

Lerner DJ et al., Agonist recognition by PAR-2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem* 271: 13943-13947, 1996

Lindner JR et al., 2000 Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol*

Lourbakos A et al., 2001 Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*

Lourbakos A et al., 1998 Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett*

Lourbakos A et al., Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 97: 3790-3797, 2001

Ludwicka-Bradley A et al., 2000 Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*

Lynch RD, Tkachuk-Ross LJ, McCormack JM, McCarthy KM, Rogers RA, Schneeberger EE. Basolateral but not apical application of protease results in a rapid rise of transepithelial electrical resistance and formation of aberrant tight junction strands in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*. 1995 Mar;66(3):257-67

Ma L et al., 2001 Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor-4 (PAR4) antagonist. *Br J Pharmacol* 134:701–704

Ma L, Hollenberg MD, Wallace JL 2001 Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor- 4 (PAR4) antagonist. *Br J Pharmacol* 134:701–704

Macfarlane et al., Proteinase-activated receptors, *Pharmacol Rev*. 2001 Jun;53(2):245-82. Review

Malcom P. Caulfield and Nigel J.M. Birdsall, International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors, PHARMA-COLOGICAL REVIEWS Vol. 50, No. 2 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998

Mall M. et al., Activation of ion secretion via proteinase-activated receptor-2 in human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Feb; 282(2):G200-10

Maoret JJ et al. Nantes, Frankreich. A mucus-secreting human colonic cancer cell line. Purification and partial characterization of the secreted mucins, *Biochem J.*, 1989 Mar 15;258(3):793.

Maren Amasheh, Ingo Grotjohann, Salah Amasheh, Anja Fromm, Johan D. Söderholm, Martin Zeitz, Michael Fromm, Jörg-Dieter Schulzke Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: A novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(10):1226-35. 2009, Vol. 44, No. 10 , Pages 1226-1235

Mari B et al., 1996 Thrombin and trypsin-induced Ca (2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J* 10:309–316

Martin Steinhoff et al., „Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response“, *Endocr Rev.* 2005 Feb;26(1):1-43.

Masaru Ishii et al., Muscarinic Acetylcholine Receptors, *Current Pharmaceutical Design*, 2006, Volume 12, Issue 28

McNamara et al., Basolateral K<sup>+</sup> channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon, *Journal of Physiology* (1999), 519.1, pp. 251—260 251

Michel A. Boivin, Dongmei Ye, John C. Kennedy, Rana Al-Sadi, Chris Shepela; Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G590-G598, 2007. First published 26 October 2006;

Miederer SE The gastric mucosal barrier. *Hepatogastroenterology.* 1986 Apr;33(2):88-91. Review

Miike S et al., 2001 Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol*

Mirza H et al., 1996 The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*; Nystedt S et al., 1996 The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol*

Moffatt JD et al., 2002 Protease-activated receptor-2 activating peptide SLIGRL inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced recruitment of polymorphonuclear leukocytes into the airways of mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*

Molino M, et al., Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *J Biol Chem* 270: 11168-11175, 1995

Morris R. et al., 1996 Thrombin receptor expression in rheumatoid and osteoarthritic synovial tissue. *Ann Rheum Dis*

Mule F et al., 2002 Signal transduction pathways involved in the mechanical responses to protease-activated receptors in rat colon. *J Pharmacol Exp*

- Murakami H, Masui H. Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3464-3468, 1980
- Muramatsu I et al., Vascular actions of thrombin receptor peptide. *Can J Physiol Pharmacol*, 1992 Jul;70(7):996-1003.
- Nakanishi-Matsui M et al., 2000 PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609–613 / Sambrano GR et al., 2001 Role of thrombin signalling in platelets in haemo-stasis and thrombosis. *Nature* 413:74–78
- Naldini A. et al., 1998 Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J Cell Physiol*
- Naldini A. et al., 2000 Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Gen Pharmacol*
- Nath SK, Desjeux JF. Human intestinal cell lines as in vitro tools for electrolyte transport studies with relevance to secretory diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1990 Dec;8(4):133-42. Review.
- Nelken NA et al., Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*, 1992
- Nguyen TD et al., 1999 Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase- activated receptor-2. *J Clin Invest* 103: 261–269
- Nicolas Cenac, Alex C., Rafael Garcia-Villar et al., PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 558.3 (2004) pp 913-925
- Nishikawa H et al., 2000 Characterization of protease-activated receptors in rat peritoneal mast cells. *Jpn J Pharmacol*
- Nystedt et al., Molecular cloning and functional expression of the encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232: 84-89, 1995
- Nystedt S et al., Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9208-12
- Nystedt S et al., 1996 The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem*
- O'Brien PJ., Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR-1 include the transactivation of PAR-2 by thrombin-cleaved PAR-1. *J Biol Chem* 275: 13502-13509, 2000
- Peter J.O. Brien, „Protease activated receptors: theme and variations”, *Oncogene*. 2001 Mar 26;20(13): 1570-81. 2001 *Pflugers Arch*. 1986 Dec;407(6):632-7
- Ramachandran R. et al, Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, Jan 2012
- Rasmussen UB et al., cDNA cloning and expression of a Hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett* 288: 123-128, 1991

- Renesto P et al., Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 89: 1944-1953, 1997
- Reynolds et al., 2007, Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human , *J Physiol.*; 582: 507-524
- Ricciardolo FLet al., 2000 Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways.*AmJ RespirCrit Care Med* 161:1672–1680
- Riewald M et al., Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit Care* 7: 123-129, 2003
- Riewald M. et al., Mechanistics coupling of protease signalling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7742-7747, 2001
- Robert A et al., *Progress in Gastroenterology Vol III* (Glass GJ ed) pp 777–801
- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, and Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77:433–443.1979
- Roberts LJ 2nd, Sweetman BJ, Lewis RA, Austen KF, and Oates JA  
Increased production of prostaglandin D2 in patients with systemic mastocytosis. *N Engl J Med* 303:1400–1404., 1980
- Rodríguez-Lagunas MJ, Martín-Venegas R, Moreno JJ, Ferrer R. PGE2 promotes Ca<sup>2+</sup>-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Aug;299(2):C324-34. Epub 2010 May 19
- Rudroff C et al., 2001 Thrombin enhances adhesion in pancreatic cancer in vitro through the activation of the thrombin receptor PAR 1. *Eur J Surg Oncol*
- Saifeddine M et al., 2001 Contractile actions of proteinase-activated receptorderived polypeptides in guinea-pig gastric and lung parenchymal strips: evidence for distinct receptor systems. *Br J Pharmacol*
- Saifeddine M et al., at proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue.*Br J Pharmacol*
- Sambrano GR et al., 2000 Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem* 275:6819–6823
- Sambrano GR et al., 2001, Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413:74–78
- Sambrano GR et al., Cathepsin G activates PAR-4 in human platelets. *J Biol Chem* 275: 6819-6823, 2000
- Sambrano GRet al., Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*; 2001 Sep 6;413(6851):74-8.
- Scarborough, R.M., Tethered ligand agonist peptides: structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.*, 267,13146 ± 13149. (1992).
- Schmidlin F et al., 2002 Proteaseactivated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* 169:5315–5321

Schmidlin F et al., Protease activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* 169: 5315–5321

Schmidlin F et al., 2001 Expression and function of proteinase-activated receptor 2 in human bronchial smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1276–1281

Schulzke et al., Epithelial and subepithelial resistance of rat large intestine: segmental differences, effect of stripping time course, and action of aldosterone. *Pflugers Arch.* 1986 Dec;407(6):632-7.

Schwiebert EM et al., Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am J Physiol.* 1994 May; 266(5 Pt 1):C1464-77

Seidler U. et al., 2001 Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransport in Normal and Cystic Fibrosis Intestine. *JOP.J.Pancreas (Online)* 2, 247-256

Shaun R. Coughlin, PARticipation in inflammation, *J. Clin. Invest.* 111:25–27, 2003

Shimizu S et al., 2000 Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*

Shin H et al., 1995 Thrombinreceptor-mediated synovial proliferation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*

Shinozuka T, Shimada K, et al. Arylamine based cathepsin K inhibitors: investigating P3 heterocyclic substituents. *Bioorg Med Chem.* 2006 Oct 15;14(20):6807-19. Epub 2006 Jul 7

Shivanna M, Srinivas SP. Elevated cAMP opposes (TNF- $\alpha$ )-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. *Mol Vis.* 2010 Sep 2;16:1781-90.

Shpacovitch VM et al., 2002 Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*

Southan C., *FEBS Lett.* 2001 Jun 8;498(2-3):214-8. Review; A genomic perspective on human proteases.

Spitz J, Hecht G, Taveras M, Aoyas E, Alverdy J. The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence. *Gastroenterology.* 1994 Jan;106(1):35-41.

Steinhoff M et al., 1999 Proteinase-activatedreceptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol*

Steinhoff M et al., 2000 Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*

Storck J et al., 1996 Trypsin induced von Willebrand factor release from human endothelial cells in mediated by PAR-2 activation. *Thromb Res*

Strigrow F et al., 2001 Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci* 14:595–608

Sugama Y et al., Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol.* 1992

Suidan HS. Et al., 1996 The thrombin receptor in the nervous system. *Semin Thromb Hemost*

Sun G et al., Interaction of mite allergens der P3 and der P9 with PAR-2-expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 167: 1014-1021, 2001

Swystun V, Chen L, Factor P, Siroky B, Bell PD, Matalon S. Apical trypsin increases ion transport and resistance by a phospholipase C-dependent rise of  $Ca^{2+}$ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 May;288(5):L820-30. Epub 2004 Dec 30.

Szaba FM, Smiley ST et al., 2002 Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*;

Takeuchi T et al., Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275: 26333-26342, 2000

Temkin V et al., 2002 Trypsin activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* 169

Thomas M.Cocks, et al, Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle *Gastroenterology* Volume 116, Issue 3 , Pages 586-592, March 1999

Tordai A. et al., 1993 Functional thrombin receptors on human T lymphoblastoid cells. *J Immunol*

Ubl JJ et al., 2002 Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thermolysin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L1339–L1348

Uehara A. et al., Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through PAR-2. *J Immunol* 169: 4594-4603, 2002

Ussing, H. H., Zerahn, K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23:110-27

Vaandrager AB et al., cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ib $\beta$ , *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4195-200.

van der Merwe JQ et al., EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 294(2):G441-51, Feb 2008

Vassallo Jr RRet al., 1992 Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem*;

Vergnolle N 1999 Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*

Vergnolle N 2000 Review article: proteinase-activated receptors — novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther.*

Vergnolle N et al., 2002 Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 169:1467–1473

Vergnolle N et al., 2005, Proteinase-Activated Receptor Biology and Function



Vergnolle N et al., 1999 Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*

Vergnolle N et al., Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7766-71

Vliagoftis H et al., 2001 Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. *J Allergy Clin Immunol* 107:679–685

Vliagoftis H et al., 2000 Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 106:537–545

von Kügelgen I., Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 2006 Jun;110(3):415-32. Epub 2005 Oct 28

Vu et al., Domains specifying thrombin-receptor interaction, *Nature*. 1991 Oct 17;353(6345):674-7

Vu et al., Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068, 1991

W. Bieger et al., Dissoziation der Serumkinetik von Amylase und Trypsin nach Stimulation mit Sekretin und Pankreomysin, *Journal of Molecular Medicine*, Volume 60, Number 21 / November 1982

Walker TR, et al. 1998 Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol*

Weiss EJ et al., 2002 Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 100:3240–3244

Weksler BB et al., 1978 Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J Clin Invest* 62:923–930

Whittle, B.J.R. and Salmon, J.A. Biosynthesis of prostacyclin and prostaglandin E2 in gastro-intestinal tissue. In *Proc. of IIB.S.G./SK&F International Workshop 'Intestinal Secretion'*, ed. Turnberg, L.A. pp.69-73. Welwyn Garden City: Smith Kline and French Publications., 1983

X. Guo et al., 1995, Stimulation of Cl<sup>-</sup> secretion by extracellular ATP does not depend on increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> in HT-29.C116E, *Am J Physiol*. 1995

Xu WF et al., 1998 Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6642–6646

Yu Z. et al., Protein-tyrosine phosphatases SHP2 is positively linked to proteinase-activated receptor-2-mediated mitogenic pathway. *J Biol Chem* 272: 7519-7524, 1997

## **5.2 Lebenslauf**

Die Seiten 98-99 enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung



### **5.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Arnold, Aumüller, Aziz, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Böhm, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuhrmann, Geks, Gemsa, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Graul, Gress, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Hilgermann, Hochban, Hoyer, Hörsch, Hofmann, Huffmann, Jacob, Jungclas, Kälble, Kaffarnik, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Koolman, Kowalski, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lehmann, Legrum, Lengsfeld, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier, Maisch, Mann, Mayer, McGregor, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pieper, Pfab, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strempel, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Zielke.

## **5.4 Danksagungen**

Mein aufrichtiger Dank für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater PD Dr. Stephan Böhm, der mir als wichtiger Ideengeber und Wegbereiter für den wissenschaftlichen Hintergrund der Arbeit stets zur Seite stand, aber auch bei der praktischen Umsetzung der manchmal schier nicht enden wollenden Versuchsreihen immer motivierend Hilfestellung gab.

Ich danke meiner Mutter, die manchmal auch als Einzige, unaufhörlich und unerschütterlich an ein erfolgreiches Ende meiner beruflichen Laufbahn geglaubt hat.

Ganz besonders schulde ich jedoch meiner Ehefrau Dank, die mich während all der Zeit mit zahllosen Höhen und Tiefen unentwegt seelisch und moralisch unterstützte.

Süha Dasdelen

Wuppertal, 13.11.2012